

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI “FEDERICO II”



Dottorato di Ricerca in Biologia Applicata XX ciclo
Curriculum in Ecologia e Microbiologia

TESI DI LAUREA SPERIMENTALE IN:
ENZIMOLOGIA

“Caratterizzazione biochimica della uracil-DNA glicosilasi-a di *S. solfataricus* e analisi della sua interazione con fattori della replicazione del DNA”

RELATORE

Ch.mo Prof.

Maurilio De Felice

CANDIDATO

Luca Esposito

CORRELATORE

Dott.^{ssa} Mariarita De Felice

ANNO ACCADEMICO 2007-2008

INDICE

1. Introduzione.....	pag. 4
1.1 La replicazione del DNA	
1.2 La riparazione del DNA	
1.3 La riparazione per escissione della base (BER)	
1.4 Gli Archaea	
1.5 Le uracil-DNA glicosilasi	
1.6 Le DNA polimerasi	
2. Materiali e Metodi.....	pag. 19
2.1 Ceppi batterici, plasmidi e vettori	
2.2 Preparazione di cellule competenti	
2.3 Trasformazione di E.coli con DNA plasmidico	
2.4 Mini-preparazione di DNA plasmidico	
2.5 Midi-preparazione di DNA plasmidico	
2.6 Elettroforesi del DNA su gel di agarosio	
2.7 Purificazione da gel di agarosio dei frammenti di DNA	
2.8 Determinazione della concentrazione proteica	
2.9 Elettroforesi delle proteine su gel denaturante di poliacrilammide	
2.10 Produzione del costrutto genico pPRO-EXHT-a-SsoUDGasi-a-His-tag	
2.11 Produzione dei mutanti della DNA pol B1	
2.12 Espressione e purificazione delle proteine ricombinanti	
2.13 Surface Plasmon Resonance (SPR)	
2.14 Immunoprecipitazione	
2.15 Saggi di attività UDGasica	
2.16 Cromatografia ad esclusione molecolare	
3. Risultati.....	pag. 36
3.1 Produzione di SsoUDGasi-a e analisi dello stato oligomerico	
3.2 Attività di SsoUDGasi-a	
3.3 Purificazione delle DNA polimerasi pol B1 e pol Y1 di <i>Sulfolobus solfataricus</i>	
3.4 Analisi dell'interazione fra Sso pol B1 e Sso pol Y1 mediante SPR	
3.5 Immunoprecipitazione di Sso pol B1 e Sso pol Y1	
3.6 Analisi dell'interazione fra il complesso Sso pol B1-pol Y1 e l'SsoUDGasi-a	
3.7 Purificazione delle forme tronche della DNA pol B1	
3.8 Surface Plasmon Resonance delle forme tronche della DNA pol B1	
4. Discussione.....	pag. 51
5. Bibliografia.....	pag. 56

Abbreviazioni

AP	Fosfatasi Alcalina
APS	Ammonio persolfato
Cdc	<i><u>C</u>ell <u>D</u>ivision <u>C</u>ontrol</i>
DTT	Ditiotritolo
ECL	chemiluminescenza elettrogenerata
EDTA	acido etilendiamminotetracetico
GST	Glutazione S-transferasi
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalattoside
LB	Luria-Bertani
LUCA	<i><u>L</u>ast <u>U</u>niversal <u>C</u>ommon <u>A</u>ncesor</i>
MCM	<i><u>M</u>ini-<u>C</u>hromosome <u>M</u>aintenance</i>
OBP	<i><u>O</u>ri<u>B</u>inding <u>P</u>roteins</i>
ORC	<i><u>O</u>ri<u>R</u>ecognition <u>C</u>omplex</i>
ORF	<i><u>O</u>pen <u>R</u>ead<u>F</u>rame</i>
PCNA	<i><u>P</u>roliferating <u>C</u>ell <u>N</u>uclear <u>A</u>ntigen</i>
PVDF	Polivinilidene Fluoruro
RPA	<i><u>R</u>eplication <u>P</u>rotein <u>A</u></i>
SPR	<i><u>S</u>urface <u>P</u>lasmon <u>R</u>esonance</i>
SSB	<i><u>S</u>ingle <u>S</u>tranded DNA <u>B</u>inding Protein</i>
TBS	tampone Tris salino
TLS	<i><u>T</u>rans-<u>L</u>esion <u>S</u>ynthesis</i>

1. Introduzione

1.1 La replicazione del DNA

In tutti gli organismi, la replicazione del DNA è un evento molto complesso che coinvolge molteplici proteine ed enzimi necessari per un'accurata ed opportuna duplicazione dell'informazione genetica. La replicazione procede in maniera differente sui due filamenti antiparalleli da cui è composta la molecola di DNA. Infatti, l'attività della polimerasi è unidirezionale, un filamento (*leading strand*) è sintetizzato in maniera continua mentre l'altro (*lagging strand*) in modo discontinuo mediante una serie di frammenti chiamati frammenti di Okazaki.

I meccanismi di replicazione del DNA sono conservati in tutte le forme di vita. Negli *Archaea* i primi studi hanno suggerito che il sistema molecolare che interviene nella replicazione è una versione semplificata di quello eucariotico. Infatti, la maggior parte delle proteine di questo macchinario ha maggiore similarità con quelle eucariotiche, mentre una piccola parte mostra similarità con quelle batteriche ed altre, invece, sembrano essere addirittura specie-specifiche.

L'intero processo di replicazione del DNA può essere diviso in tre fasi distinte: l'inizio, l'allungamento e la terminazione. Nei batteri le tre fasi sono relativamente ben conosciute. Per quanto riguarda gli eucarioti, sebbene ci siano progressi sempre più importanti, le fasi d'inizio e terminazione non sono state ancora chiarite.

L'inizio della replicazione del DNA avviene a partire da regioni del cromosoma chiamate origini di replicazione. Tutte le sequenze d'origini note presentano caratteristiche comuni come la presenza d'elementi ripetuti e invertiti (IR), filamenti con purine e pirimidine alternate, ma soprattutto lunghi tratti ricchi in A e T (Boulikas T., 1996). Sebbene tutte le origini abbiano caratteristiche simili fra loro, esse possono variare nella lunghezza che può estendersi da 100 a 1000 paia di basi (bp) (Boulikas T., 1996).

La divulgazione di numerose sequenze genomiche batteriche ha permesso di osservare che sul *leading strand* del DNA è presente un maggior numero di guanine rispetto alle citosine (Lobry J.R., 1996). A livello delle origini di replicazione e dei siti di terminazione questa differenza cambia drasticamente. Una tecnica chiamata “skew analysis” permette di identificare ipotetiche origini di replicazione e siti di terminazione sfruttando questa variazione della composizione in basi tra i due filamenti del DNA genomico. La maggior parte delle origini di replicazione degli *Archaea*, analogamente a ciò che è stato osservato nei batteri, sono localizzate in regioni contenenti geni che codificano per altri fattori replicativi quali Cdc6/ORC-1, elicasi, DNA polimerasi e proteine accessorie della polimerasi stessa.

1.2 La riparazione del DNA

I genomi di tutti gli organismi viventi possono essere danneggiati sia da agenti chimici che fisici presenti nell'ambiente (ad esempio raggi UV, mutageni chimici, tossine batteriche e funginee) e da radicali liberi o agenti alchilanti, prodotti durante reazioni del metabolismo cellulare. Inoltre il patrimonio genetico cellulare può essere danneggiato anche da errori durante la replicazione del DNA.

Le mutazioni derivanti da questi eventi possono essere: basi modificate, delezioni, inserzioni, dimeri di pirimidina, rotture dei filamenti, appaiamento erraneo o mancata incorporazione delle basi. Di particolare interesse sono le lesioni che riguardano l'idrolisi delle basi del DNA. A tal proposito, il danno più frequente è la deamminazione della citosina che porta alla formazione dell'uracile (Lindahl, T., and Nyberg, B.;1974). Quindi, sul doppio filamento di DNA si forma un mismatch G-U. Poiché l'uracile si appaierà con l'adenina, nel successivo ciclo di replicazione del DNA, la deamminazione della citosina provocherà la transizione dalla coppia G-C alla coppia A-T, se il danno non viene riparato.

L'idrolisi della citosina è un evento molto favorito dalle alte temperature per cui gli organismi ipertermofili sono più suscettibili a questo tipo di mutazione (Lindahl, T., and Nyberg, B.; 1974).

Tutte le lesioni al DNA possono essere genotossiche o citotossiche per le cellule. Quindi tutti gli organismi hanno sviluppato sofisticati meccanismi per monitorare e salvaguardare l'integrità del proprio genoma, affinché la trasmissione del materiale genetico avvenga in maniera altamente fedele.

La maggior parte degli organismi risponde ai danni attivando efficaci meccanismi per riparare il DNA. (Khanna KK. and Jackson SP.; 2001)

I più studiati meccanismi di riparazione del DNA sono: la riparazione per escissione della base (BER), la riparazione per escissione dei nucleotidi (NER), il bypass, la riparazione per rottura dei filamenti e la riparazione dei mismatch.

1.3 La riparazione per escissione della base (BER)

La perdita o il danneggiamento di una base del DNA è un evento che avviene con un'elevata frequenza nelle cellule (in una cellula sono danneggiate e idrolizzate circa 10^4 basi al giorno). Quindi la riparazione del DNA è fondamentale per mantenere l'integrità genomica. La riparazione per escissione della base (BER) è il principale meccanismo attraverso cui una cellula ripara le basi danneggiate. Il modello più accreditato è che tale meccanismo comprenda cinque reazioni sequenziali: (1) la rimozione della base (2) l'incisione del DNA a livello del sito abasico (3) il processamento del filamento inciso (4) la sintesi del DNA (5) la cucitura del DNA (Fortini P. *et al.*, 2003).

Finora sono stati identificati due *subpathways* del BER che si differenziano per il numero totale di nucleotidi che sono sostituiti sul filamento di DNA danneggiato. Il primo riguarda la riparazione di un singolo nucleotide (SN-BER), mentre il secondo riguarda la sostituzione di due o più nucleotidi ed è detto long-patch BER (LP-BER) (Liu Y. *et al.*, 2007). Generalmente il SN-BER inizia con il

riconoscimento della base danneggiata da parte di una DNA Glicosilasi, che idrolizza il legame N-glicosidico della base danneggiata formando così un sito abasico (Lindahl, T.; 1993; Lindahl, T.; 1982). Successivamente una endonucleasi apurinica/apirimidinica (APE) incide il filamento di DNA danneggiato, al 5' del sito abasico, generando un *gap* sul DNA. (Doetsch, PW and Cunningham, RP, 1990; Mosbaugh, DW and Bennett, SE, 1994). Quindi la DNA polimerasi β (Pol β) riempie il *gap* rimuovendo la base danneggiata. (Matsumoto, Y., and Kim, K., 1995; Piersen *et al.*, 1996). Infine il DNA neosintetizzato viene ricucito da una DNA ligasi.

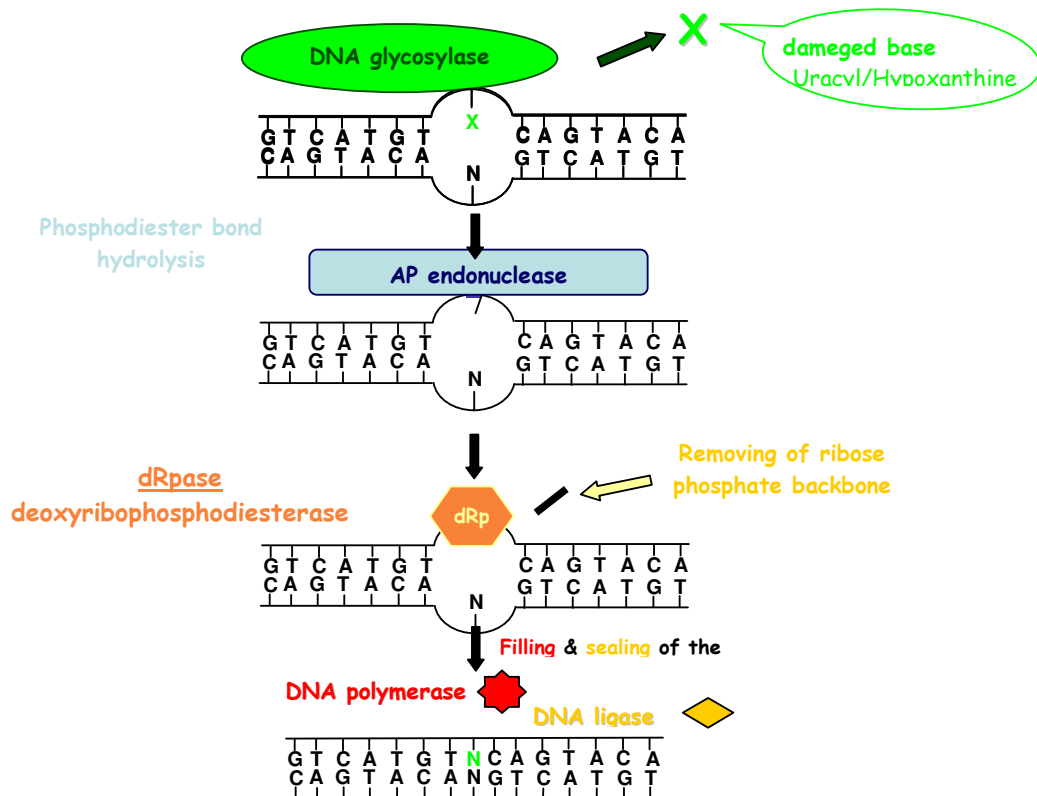


Fig.1.1 Rappresentazione schematica del meccanismo del BER

1.4 Gli Archaea

Gli Archaea sono stati identificati come “il terzo dominio dei viventi” (Woese *et al.*, 1990). Suddivisi in tre phyla principali (crenarchaeota, euryarchaeota e korarchaeota), essi presentano una morfologia cellulare procariotica con assenza di strutture nucleari, citoscheletro ed organelli (Edgell, DR. and Doolittle, WF., 1997; Olsen GJ. and Woese CR., 1997). Come per i processi metabolici, anche l'organizzazione genomica sembra essere di tipo procariotico: infatti la replicazione del DNA per alcune specie studiate sembra prendere inizio da una singola origine e procedere bi-direzionalmente (Myllykallio *et al.*, 2000), mentre nel singolo cromosoma della specie *Sulfolobus solfataricus* (SsoMCM) sono state individuate tre attive origini di replicazione del DNA (Robinson *et al.*, 2004; Lundgren *et al.*, 2004).

La sequenza completa del genoma di molte specie archeobatteriche indica che i complessi molecolari coinvolti in processi quali replicazione, riparazione e ricombinazione del DNA sono costituiti da fattori proteici più simili a quelli eucariotici che non batterici. Inoltre, alcune specie di euryarchaeota contengono omologhi di proteine istoniche eucariotiche che non si trovano nei batteri (Reeve *et al.*, 1997; Pereira *et al.*, 1997). Queste evidenze fanno degli Archaea un modello semplificato da cui attingere informazioni utili alla comprensione dei meccanismi di replicazione, riparazione e ricombinazione del DNA.

1.5 Le uracil-DNA Glicosilasi

Le DNA-Glicosilasi sono gli enzimi che intervengono nel primo *step* del principale processo di riparazione del DNA, il BER, riconoscendo e rimuovendo la base danneggiata (Cunningham, R.P., 1997, Krokan, H.E., Standal, R. and Slupphaug, G., 1997).

Le Uracil-DNA-Glicosilasi (UDGasi) sono le prime DNA glicosilasi ad essere state scoperte (Lindahl, T., 1974) e sono gli enzimi che proteggono il DNA da mutazioni causate dall'errata

incorporazione di residui di uracile da parte della DNA polimerasi oppure mutazioni causate dalla deaminazione spontanea di residui di citosina.

Questi enzimi idrolizzano il legame N-glicosidico fra la base (uracile) e lo zucchero, lasciando così un sito abasico sul filamento di DNA (Figura 1.1).

Questo meccanismo di rimozione dell'uracile sembra essere non solo essenziale, ma è anche uno dei più comuni sistemi di riparo del DNA. Infatti nella maggiorparte degli organismi viventi sono stati identificati sia i geni UDG-omologhi che i corrispondenti enzimi (Cunningham,R.P., 1997; Krokan,H.E., Standal,R. and Slupphaug,G., 1997).

I geni che codificano per UDGasi sono stati identificati nei batteri, nei virus e negli eucarioti incluso l'uomo (Lindahl,T., 1974; Savva, *et al.*, 1995; Percival, *et al.*, 1989; Slupphaug,G. *et al.*, 1993). Essi possono essere classificati in sei differenti famiglie soprattutto per quanto riguarda le differenze nel riconoscimento delle basi danneggiate e le loro sequenze amminoacidiche (Pearl,L.H., 2000; Sartori, *et al.*, 2002; Yang, *et al.*, 2000). Le sei famiglie sono rispettivamente: la famiglia Ung (famiglia I) (Lindahl,T., 1974; Putnam, *et al.*, 1999; Mol, *et al.*, 1995), la famiglia MUG/TDG (famiglia II) (Gallinari,P. and Jiricny,J., 1996; Nedderman,P. and Jiricny,J., 1993), la famiglia sMUG (famiglia III) (Haushalter, *et al.*, 1999), la famiglia delle UDG termostabili (famiglia IV, TmUDG) (Sandigursky,M. and Franklin,W.A., 1999; Sandigursky,M. and Franklin,W.A., 2000; Hinks,J.A., *et al.*, 2002), la famiglia delle UDG-B (famiglia V) (Sartori,A.A., *et al.*, 2002; Starkuviene,V. and Fritz,H.J., 2002) e la famiglia VI. Tutte le UDGasi appartenenti alle prime cinque famiglie, pur mostrando una limitata similarità di sequenza, hanno tutte due motivi di sequenza conservati nel sito attivo (il motivo A e B) (Pearl,L.H., 2000; Sartori,A.A., *et al.*, 2002) (Figura 1.2).

Anche in molti Archaea sono stati identificati geni analoghi a quelli che codificano per Uracil-DNA Glicosilasi e sono state caratterizzate le relative proteine (UDGasi termostabili, famiglia IV).

(Sandigursky,M. and Franklin,W.A., 1999; Sandigursky,M. and Franklin,W.A., 2000; Hinks,J.A., *et al.*, 2002).

Questi enzimi sono in grado di rimuovere l'uracile sia da un substrato di DNA a doppio che a singolo filamento.

	Motif A	Motif B
Family 1 : <i>HuUDG</i> , <i>EcdUDG</i> , <i>SceUDG</i> (UNG)	G Q D P Y	H P S P L S A
Family 2 : <i>HuTDG</i> , <i>EcoMUG</i> , <i>SpoThp1</i> (MUG/TDG)	G I N P G	M P S S S A R
Family 3 : <i>HusMug1</i> , <i>XldUDG</i> , <i>MmuUDG</i> (sMUG)	G M N P G	H P S P R N P
Family 4 : <i>AfuUDG</i> , <i>TmaUDG</i> , <i>PaeUDGa</i> (TmUDG) <i>ThtUDGa</i>	G E A P G	H P A A V L R
Family 5 : <i>PaeUDGb</i> , <i>ThtUDGb</i> , <i>Mtu</i> (UDG-B)	G L A P A	H P S P L N V
Family 6 : <i>MjUDG</i> , <i>AaeUDG</i> , <i>Tvo</i> , (MjUDG) <i>Dde</i>	HhH motif	4Fe-4S binding

Fig.1.2 Classificazione delle UDGasi

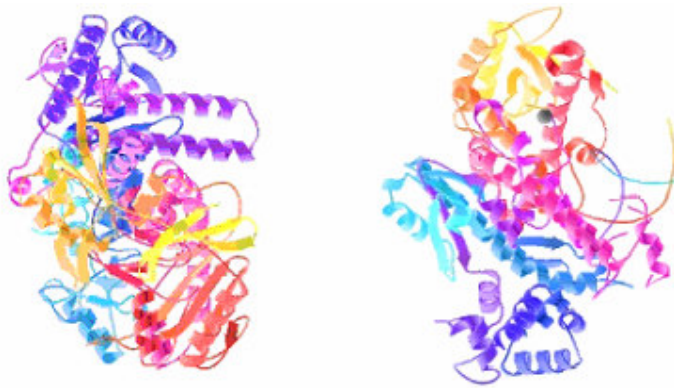
1.6 Le DNA Polimerasi

La sopravvivenza delle specie richiede una precisa trasmissione dell'informazione genetica di generazione in generazione. Allo stesso tempo, però, ogni organismo deve tollerare piccole mutazioni che possono portare vantaggi nelle generazioni successive. Oltre ad un'enorme varietà di meccanismi di riparo, uno *step* comune è la sintesi del DNA, effettuata da DNA polimerasi

specializzate. Diverse DNA polimerasi sono conosciute nei batteri, negli eucarioti e negli Archaea ed il loro funzionamento dipende da numerose proteine accessorie. Le DNA polimerasi sono coinvolte non solo nella replicazione ma anche nella riparazione del DNA. Gli enzimi coinvolti nei processi di riparazione hanno il compito di riconoscere e correggere i danni presenti sul DNA prima che questo sia replicato, ma è inevitabile che la DNA polimerasi replicativa incontri delle lesioni non riparate.

Le DNA Polimerasi possono essere divise in sei famiglie (tabella 1.1) in base alla loro similarità di sequenza con le DNA pol I, II, III di *E. coli* (rispettivamente classe A, B e C) (Braitwaite D.K and Ito J., 1993), la Pol II euriarchaeota (classe D), la Pol β umana (classe X) ed UmuC/DinB di *E. coli* e Rad30 variante dello *Xeroderma pigmentosum*. Le famiglie A, B, C e D sono coinvolte nella replicazione dei cromosomi, mentre le famiglie X e Y sono coinvolte nei vari sistemi di riparazione del DNA. Tutti gli enzimi eucariotici noti appartengono alle classi A, B, X o Y (Nohmi T., 2006). La DNA polimerasi I di *E. coli* è il modello degli enzimi appartenenti alla **famiglia A**: sono proteine monomeriche di circa 100 kDa a cui sono associate attività 3'-5'/5'-3' esonucleasiche oltre all'attività di sintesi del nuovo filamento di DNA. L'attività 3'-5' esonucleasica è responsabile dell'accuratezza della replicazione (*proof-reading*); mentre l'attività in direzione 5'-3' esonucleasica è implicata nella rimozione dei *primers* ad RNA o delle basi danneggiate durante le reazioni di riparazione del DNA. Questa famiglia comprende prevalentemente enzimi di batteri mesofili; l'unica eccezione è rappresentata dalla Pol γ mitocondriale.

La **famiglia B** è più eterogenea essendo composta da polimerasi batteriche, eucariotiche e virali (fig 1.3). La DNA Polimerasi II di *E. coli* è un monomero con attività 3'-5' esonucleasica e sembrerebbe essere coinvolta nei meccanismi di riparazione. Le DNA polimerasi eucariotiche appartenenti a tale gruppo, hanno invece un ruolo nella replicazione genomica.



A: *Desulfurococcus* strain Tok

B. *E. coli* frammento di Klenow

Fig 1.3 Strutture atomiche delle DNA polimerasi di tipo B di *Desulfurococcus* e *E. coli*.

Nella *famiglia C* troviamo l'oloenzima DNA Polimerasi III di *E. coli*, responsabile della replicazione del genoma. Il “nucleo” dell'enzima contiene le subunità α , ϵ e θ ; la subunità α è responsabile dell'attività polimerasica, ϵ è dotata dell'attività 3'-5' esonucleasica, θ potrebbe essere necessaria per l'assemblaggio enzimatico. L'aggiunta della subunità τ provoca la dimerizzazione del *core* enzimatico. La formazione dell'oloenzima viene completata con l'aggiunta del complesso $\gamma\delta$ e delle “pinze” β -clamp.

La *famiglia D* include le DNA polimerasi eterodimeriche descritte da Ishino (1999) presenti solo negli euryarchaea. Tali enzimi sono costituiti da due subunità di circa 140 kDa (DP2) e di 70 kDa (DP1). La subunità DP1 mostra una discreta similarità con la subunità piccola della polimerasi δ eucariotica, *in vitro* essa è responsabile dell'attività 3'-5' esonucleasica. DP2 è la subunità catalitica ed è infatti la più conservata tra le specie.

La *famiglia X*, il cui modello è la polimerasi β eucariotica, è costituita dalle DNA polimerasi coinvolte nei diversi meccanismi di riparazione del DNA. Queste DNA polimerasi hanno anche un'attività 5'-2-deossiribo-5-fosfatoligasica ed alcune di esse, come la terminal-deossiribonucleotidil-trasferasi (TdT), sono coinvolte nei processi di variabilità dei geni dei recettori antigenici V(D)J.

La *famiglia Y* è conosciuta anche come la superfamiglia DinB e i suoi membri sono presenti in eucarioti, batteri ed archaea; Rev1 e Rad30 sono presenti solo negli eucarioti; UmuCD, esiste solo nei batteri. Questa famiglia è caratterizzata da DNA polimerasi con bassa processività e bassa fedeltà di sintesi in quanto prive della attività 3'-5' esonucleasica. Le DNA polimerasi appartenenti a questa famiglia sono caratterizzate dalla propensione a superare i danni che si trovano sul filamento di DNA stampo (*Trans-Lesion Synthesis*, TLS), danni che bloccano la sintesi da parte delle DNA polimeasi delle altre famiglie. Ciascun enzima varia per dimensioni e numero di subunità, ma tutte conservano dei residui critici per la attività di sintesi (Yang W., 2005).

Generalmente le DNA polimerasi sono enzimi multifunzionali. Studi cristallografici e mutazionali hanno dimostrato che l'attività sintetica e quella esonucleasica sono organizzate in domini distinti; la prima è stata individuata nel dominio C-terminale, mentre l'attività di *proof-reading* si trova nella regione N-terminale.

Gruppo	Enzimi
Famiglia A	DNA polimerasi eubatteriche: <i>E. coli</i> DNA pol I, <i>T. aquaticus</i> pol I, <i>S. pneumoniae</i> pol I DNA polimerasi batteriofaghe: T5 DNA pol, T7 DNA pol DNA polimerasi mitocondriali: <i>S. cerevisiae</i> DNA pol γ
Famiglia B	DNA polimerasi eubatteriche: <i>E. coli</i> DNA pol II DNA polimerasi batteriofaghe: Φ 29 DNA pol, T4 DNA pol, RB69 pol DNA polimerasi degli Archaea: <i>S. Solfatarius</i> DNA pol I, <i>T. litoralis</i> DNA pol I, <i>P. furiosus</i> DNA pol I DNA polimerasi eucariotiche: <i>H. sapiens</i> DNA pol α , <i>S. cerevisiae</i> DNA pol α <i>H. sapiens</i> DNA pol δ , <i>S. cerevisiae</i> DNA pol δ , <i>S. cerevisiae</i> DNA pol ϵ , <i>S. cerevisiae</i> DNA pol ξ DNA polimerasi virali: Herpes simplex-1 DNA pol, Vaccinia virus DNA pol, Adenovirus 2 DNA pol
Famiglia C	DNA polimerasi eubatteriche: <i>E. coli</i> DNA pol III, <i>B. subtilis</i> DNA pol III
Famiglia D	DNA polimerasi degli Euriarchaea: <i>P. horikoshii</i> PolD, <i>P. furiosus</i> PolD
Famiglia X	DNA polimerasi eucariotiche: <i>H. sapiens</i> DNA pol β , <i>H. sapiens</i> DNA pol μ , <i>H. sapiens</i> DNA pol λ , <i>H. sapiens</i> TdT (<i>terminal-deoxyribonucleotidyl transferase</i>) <i>S. cerevisiae</i> DNA pol IV
Famiglia Y	DNA polimerasi eubatteriche: <i>E. coli</i> DNA pol IV (DinB), <i>E. coli</i> DNA pol V (Umu CD) DNA polimerasi degli Archaea: <i>S. Solfatarius</i> DNA polY1 (omologo di DinB) DNA polimerasi eucariotiche: <i>H. sapiens</i> DNA pol η , <i>S. cerevisiae</i> DNA pol η , <i>H. sapiens</i> DNA pol ι , <i>H. sapiens</i> DNA pol κ , <i>S. cerevisiae</i> Rev 1

Tabella 1.1 Classificazione delle DNA polimerasi

Analizzando le strutture di diverse DNA polimerasi, si può notare che l'organizzazione tridimensionale di questi enzimi è molto conservata, assomigliano ad una “mano destra” con dita (*fingers*), palmo (*palm*) e pollice (*thumb*) (fig 1.4).

Il palmo è il dominio più conservato. Esso è costituito da strutture β e presenta i 3 residui carbossilici che formano il sito catalitico della polimerasi. Il pollice è una α -elica flessibile che interagisce con i prodotti di DNA a doppio filamento mentre le dita sono in contatto con il filamento stampo.

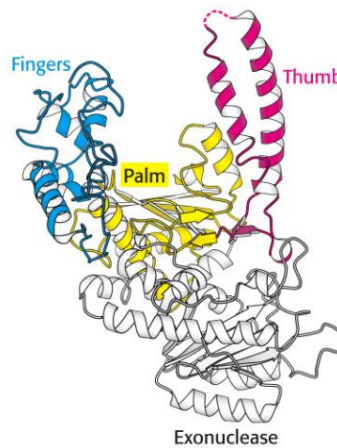


Fig 1.4 Struttura di una DNA polimerasi di famiglia B

Tutti i genomi di euryarchaea finora sequenziati, fatta eccezione per *Halobacterium* NRC-1, mostrano una singola DNA polimerasi monomerica di famiglia B; in aggiunta a questa polimerasi presentano la polimerasi eterodimerica Pol D, caratteristica dei soli euryarchaea. Alcuni *Archaea*, inoltre, codificano per delle TLS (*Trans-Lesion Synthesis*) DNA polimerasi di famiglia Y (Kulaeva *et al.*, 1996), enzimi capaci di superare basi con lesioni presenti sul filamento di DNA stampo, come basi deaminate o ossidate, dimeri prodotti dall'esposizione agli UV o siti abasici (AP). La TLS può a volte portare a una mis-incorporazione di basi o generare mutazioni che causano *frameshift*.

I crenarchaeota presentano nel loro genoma varie DNA polimerasi di famiglia B, ma non presentano enzimi di tipo D.

Sulfolobus solfataricus e *S. shibatae* (Pisani *et al.*, 1992; Edgell *et al.* 1997), *Aeropyrum pernix* (Cann *et al.*, 1999; Kawarabayasi *et al.*, 1999) e *Sulfurisphaera ohwakuensis* (Iwai *et al.*, 2000) possiedono 3 geni codificanti per ipotetiche DNA polimerasi di tipo B. Tali polimerasi sono chiamate DNA pol B1, B2 e B3.

In conclusione i crenarchaeota e gli euryarchaeota non hanno le stesse DNA polimerasi, ciò evidenzia quindi la loro precoce separazione nel corso del processo evolutivo.

Il crenarchaeota ipertermofilo *Sulfolobus solfataricus* presenta due DNA polimerasi funzionali Pol B1 e Pol Y1.

La DNA polimerasi Pol B1(fig. 1.5) è una delle prime DNA polimerasi di Archaea isolate e caratterizzate (Rossi *et al.*, 1986). È un monomero di circa 110 kDa con due funzioni catalitiche: una 3'-5' esonucleasi di cui è responsabile il dominio N-terminale ed un'attività polimerasica dipendente da ioni Mg^{2+} al C-terminale. I due domini sono connessi da un *loop* idrofilico ricco in glicine, sensibile al taglio proteolitico (fig. 1.6, Regione 1).



Fig 1.5 Struttura di DNA pol B1 di *S. solfataricus*

Nel dominio N-terminale sono presenti i 3 motivi Exo conservati nelle polimerasi delle famiglie A e B mentre la regione C-terminale contiene i 5 motivi polimerasici altamente conservati descritti da Blanco *et al.* (1991).

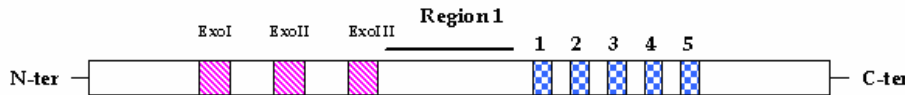


Fig 1.6 DNA pol B1: rappresentazione schematica dei motivi catalitici

La proteina subisce dei cambiamenti conformazionali quando lega il DNA (Pisani *et al.*, 1998). Inoltre studi mutagenici hanno dimostrato che la sequenza Y-GG/A situata nella regione 1, presente in molte polimerasi, interagisce direttamente con l'ibrido DNA stampo/RNA *primer* ed è responsabile della processività dell'attività 3'-5' esonucleasica.

Nella regione N-terminale delle DNA polimerasi degli Archaea è presente un dominio caratteristico chiamato: “l'*Uracil Binding Pocket*”. Tale dominio è in grado di riconoscere l'uracile presente sul DNA stampo, determinando lo stallo della polimerasi 4 basi prima della lesione.

Nel genoma di *Sulfolobus sulfataricus* è stata identificata una ORF codificante per una ulteriore polimerasi appartenente alla famiglia Y: DNA Pol Y1 (Kulaeva *et al* 1996). Questo enzima (fig 1.7), monomero di 45 kDa, è specializzato nella riparazione del DNA aberrante, ma mostra bassa fedeltà su un normale DNA stampo poiché non presenta nessuna attività esonucleasica. Pur mantenendo una conformazione simile a tutte le DNA polimerasi e conservandone i siti catalitici, essa presenta un ulteriore dominio di legame al DNA assente nelle altre DNA polimerasi (*little finger*).

Studi cristallografici (Ling *et al* 2001) suggeriscono che la capacità di oltrepassare le lesioni sia dovuta ad un sito attivo più aperto e a dita più piccole.



Fig 1.7 Struttura di DNA pol Y1 di *S. sulfataricus*

Un contatto più debole con il DNA e la traslocazione contemporanea di 2 basi dello stampo nel sito attivo sembrano essere il meccanismo che permette a questo enzima di sintetizzare di fronte ai danni della molecola di DNA.

Sono stati effettuati dei saggi di allungamento del *primer* (*primer extension*) utilizzando come stampo sequenze di 36 nucleotidi su cui erano presenti diversi tipi di lesioni: siti abasici (AP site), uracile (U) o ipoxantina (HX), 8-Oxo-Guanina (8-oxo-G).

I risultati mostrano che i residui U e HX, rispettivamente i prodotti di deaminazione di C e A, sono riconosciuti dalla DNA pol B1 per mezzo dell'uracil-binding pocket. L'enzima si ferma 3-4 basi prima dell'U e 1 base prima del HX, sebbene sia riscontrabile una minima capacità di sintesi specialmente nel caso del HX. PolY1 è invece capace di sintetizzare prodotti *full-length*.

La 8-OxoGuanina inibisce l'azione della PolB1, bloccandola mentre non influisce sull'azione della PolY1, che incorpora ATP, dando quindi origine ad un percorso mutagenico (Gruz *et al.* 2003).

Ci sono opinioni contrastanti sull'attività di PolY1 sui templati contenenti siti AP. Gruz *et al.* (2003), effettuando saggi ad una temperatura di 55°C, osservavano che la PolY1 non è in grado di

superare il sito AP. Al contrario Boudsocq *et al.* (2001) a 37°C riportano una efficiente capacità da parte della DNA PolY1 di superare il danno.

Da questi risultati si può ipotizzare che durante la replicazione possa verificarsi uno scambio tra gli enzimi quando la DNA polimerasi replicativa “sente” un danno sul cromosoma.

Attualmente si ritiene che nel momento in cui si verifica un blocco della replicazione, per un qualsiasi danno sul DNA, avvenga uno scambio tra DNA polimerasi. La nuova DNA polimerasi capace di effettuare la TLS (*Trans-Lesion Synthesis*), inserirà dei nucleotidi in corrispondenza del danno sul nuovo filamento. A questa inserzione seguirà una piccola estensione e poi un altro scambio di enzimi con il ritorno alla DNA polimerasi replicativa.

Ancora non si conoscono quali siano gli eventi che determinano l'intervento di una delle DNA polimerasi coinvolte nella TLS, ma è sicuro che queste giochino un ruolo importante nella stabilità genomica.

Per questo motivo lo studio del meccanismo della TLS è di particolare importanza nella ricerca contro il cancro.

2. Materiali e Metodi

2.1 Ceppi batterici, plasmidi e vettori

Il plasmide pGEX-4T-2 (Pharmacia) è un derivato del vettore pGEX. Esso contiene il promotore *taq* per l'espressione, l'allele *lacI^q* per poter essere ospitato in qualunque ceppo di *E. coli*, un sito di riconoscimento per la trombina per permettere il taglio della proteina d'interesse dalla Glutathione S-transferasi (GST).

pTrcHis è un vettore d'espressione che permette di inserire a monte della proteina sei residui di istidine per facilitarne la successiva purificazione.

2.2 Preparazione di cellule competenti

500 ml di terreno LB (10 g NaCl, 5 g estratto di lievito e 10 g di triptone per un litro di soluzione) venivano inoculati con una singola colonia di cellule precedentemente strisciate su piastra LB agar (15 g agar per litro di LB). La coltura veniva incubata a 37°C con agitazione per una la notte. Quando le cellule raggiungevano 0.45-0.55 O.D. a 600 nm, venivano raffreddate in ghiaccio per 30 minuti e centrifugate per 15 minuti a 2500 x g. Il pellet veniva risospeso in 10-20 ml di una soluzione 100 mM CaCl₂ sterile, raffreddato in ghiaccio e portato a 500 ml con la stessa soluzione. Dopo un'incubazione in ghiaccio per 15 minuti, la sospensione veniva centrifugata per 10 minuti a 1800 x g. Il pellet veniva risospeso in 25 ml di una soluzione 100 mM CaCl₂ sterile e un ugual volume di glicerolo 60% sterile. Le cellule venivano quindi aliquotate e conservate a -80°C.

2.3 Trasformazione di *E. coli* con DNA plasmidico

La miscela di reazione con T4 DNA ligasi o 100 µg/µl di plasmide, veniva aggiunta a 200 µl di cellule competenti e tenuta in ghiaccio per 30 minuti, quindi a 37°C per 5 minuti e ancora in ghiaccio per 10 minuti. Si aggiungevano 800 µl di LB e si incubava a 37°C per 45 minuti con agitazione. Circa 300 µl venivano piastrati su terreno LB agar addizionato con l'opportuno

antibiotico (100µg/ml per ampicillina e 30µg/ml per cloramfenicolo). Le piastre venivano incubate a 37°C per una notte.

2.4 Mini-preparazione di DNA plasmidico

La mini preparazione di DNA plasmidico è stata effettuata con il sistema della Qiagen. Una singola colonia veniva inoculata in 2 ml di LB contenente ampicillina (100 µg/ml) ed il terreno così inoculato era incubato a 37°C per una notte. 1.5 ml di coltura batterica veniva trasferito in tubi eppendorf da 1.5 ml e quindi si centrifugava per 2 minuti. Il pellet veniva risospeso in 250 µl di buffer P1 (50 mM Tris/HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml Rnase A) ed alla sospensione batterica così ottenuta si aggiungevano 250 µl di buffer P2 (200 mM NaOH, 1% SDS). Dopo mescolamento si aggiungevano 350 µl di buffer N3 per neutralizzare l'idrossido di sodio e la soluzione veniva agitata per inversione in modo che i lipidi e l'SDS precipitassero lasciando in soluzione il DNA plasmidico. Infine, è stato centrifugato per 10 minuti a 16000 x g ed il sovrantante veniva caricato su una colonna QIAprep e centrifugato per 30 secondi. In questo modo la soluzione eluiva dalla colonna mentre il DNA veniva trattenuto dalla resina. Infine, 750 µl di soluzione PE venivano caricati sulla colonna per lavare il DNA legato, si centrifugava per 30 secondi a 16000 x g per allontanare la soluzione di lavaggio. Il DNA veniva eluito mediante l'aggiunta di 50 µl di buffer EB (10 mM Tris/HCl, pH 8.5) e successiva centrifugazione per 30 secondi a 16000 x g.

2.5 Midi-preparazione di DNA plasmidico

La midi-preparazione di DNA plasmidico è stata effettuata con il sistema della Qiagen. Una singola colonia veniva inoculata in 2 ml di LB contenente ampicillina (100 µg/ml), e lasciata in agitazione per 4-5 ore a 37°C. Questa sospensione batterica veniva usata come preinoculo per 200-500 ml di LB contenente ampicillina (100 µg/ml) e l'inoculo risultante veniva incubato a 37°C con agitazione

per una notte. La mattina seguente la coltura veniva centrifugata a 3000 x g a 4°C per 15 minuti ed il pellet veniva risospeso in 10 ml di tampone P1 (50 mM Tris/HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml Rnase A). Alla sospensione batterica così ottenuta si aggiungevano 10 ml di tampone P2 (200 mM NaOH, 1% SDS) e, dopo mescolamento, si incubava a temperatura ambiente per 5 minuti. Alla miscela si aggiungevano 10 ml di tampone P3 (3M acetato di potassio, pH 5.5), si incubava in ghiaccio per 15-20 minuti e si centrifugava a 20000 x g a 4°C per 30 minuti. Il sovrinatante veniva recuperato e nuovamente centrifugato a 20000 x g per 15 minuti a 4°C. Una colonna preimpaccata con una resina a scambio anionico veniva equilibrata con 10 ml di tampone QBT (50 mM MOPS, pH 7.0, 750 mM NaCl, 15% etanolo, 0.15% Triton X-100). Il sovrinatante suddetto era caricato sulla colonna. Seguono lavaggi con 30 ml di tampone QC (50 mM MOPS, pH 7.0, 1M NaCl, 15% etanolo) per 2 volumi. Il DNA plasmidico veniva eluito con 15 ml di tampone QF (50 mM Tris/HCl, pH 8.5, 1.25 M NaCl, 15% etanolo) e successivamente precipitato con 0.7 volumi di isopropanolo. Si centrifugava a 15000 x g per 30 minuti a 4°C e, dopo rimozione del sovrinatante, il pellet veniva lavato con 5 ml di etanolo al 70%, asciugato e risospeso in un volume opportuno di soluzione TE.

2.6 Elettroforesi del DNA su gel di agarosio

L'elettroforesi per la separazione dei frammenti di DNA veniva effettuata su gel di agarosio all'1% (peso/volume) in presenza di un opportuno *marker* di peso molecolare (1 Kb Ladder NEB). Per la preparazione del gel, 1 g di agarosio veniva sciolto in 100 ml di TAE (40 mM Tris-base, 1 mM acido acetico e 10 mM EDTA, pH 8.0). Quando la soluzione era sufficientemente fredda, si aggiungeva bromuro di etidio alla concentrazione finale di 1 µg/ml. Ai campioni da sottoporre ad analisi elettroforetica veniva aggiunta una quantità di *loading buffer* 10 volte concentrato in modo che la concentrazione finale fosse 0.042% blu di bromofenolo, 0.042% cilene cianolo FF, 5% glicerolo.

2.7 Purificazione da gel di agarosio dei frammenti di DNA

La purificazione dei frammenti di DNA è stata effettuata con il sistema QIAEX II (Qiagen). Il sistema si basa sull'adsorbimento di molecole di DNA da 40 bp fino a 50 Kb a particelle di silice in presenza di un'elevata concentrazione di un sale caotropico.

Il gel di agarosio veniva tagliato in corrispondenza della banda di interesse evidenziata tramite colorazione con bromuro di etidio. Il pezzo di gel così ottenuto veniva pesato. Per ottenere la solubilizzazione si aggiungevano 300 µl di tampone QG per 100 mg di gel. L'alta concentrazione di sale caotropico nel tampone QG, indebolisce i legami idrogeno tra gli zuccheri del polimero di agarosio favorendo così la solubilizzazione del gel. Inoltre tale tampone favorisce la dissociazione delle proteine che legano il DNA.

La miscela veniva incubata per 10 minuti a 50°C e sottoposta ad agitazione con vortex ogni 2 minuti. Alla soluzione veniva aggiunto un volume di isopropanolo per aumentare la resa finale. Si centrifugava per 30 secondi a 16750 x g per permettere al DNA di adsorbirsi sulla resina e il DNA veniva quindi lavato con 750 µl di buffer PE (tale tampone, contiene etanolo quindi favorisce l'allontanamento dei sali contaminanti) infine, si centrifugava a 16750 x g per allontanare le tracce di etanolo e il DNA veniva recuperato caricando sulla colonna 50 µl di buffer EB (10 mM Tris/HCl pH 8.5) e centrifugando per un minuto a 16750 x g.

2.8 Determinazione della concentrazione proteica

Il saggio proteico Bio-Rad usato per la determinazione della concentrazione proteica si basa sulla variazione di colore di una soluzione acida di Comassie Brilliant Blue G-250 (mix Bio-Rad) in presenza di proteine: infatti si osserva una variazione di assorbanza da 465 nm a 595nm proporzionale alla concentrazione proteica. Le soluzioni proteiche di cui si voleva conoscere la

concentrazione, venivano aggiunte a 200 µl di mix Bio-Rad e si portava ad 1 ml con H₂O. Dopo agitazione si incubava per 5 minuti a temperatura ambiente. Veniva preparato un campione privo di proteina che veniva usato come bianco. Si leggeva l'assorbanza a 595 nm contro il bianco. Il saggio è stato effettuato su tre campioni contenenti diverse concentrazioni di BSA. I valori di assorbanza letti a 595 nm venivano riportati in grafico contro la concentrazione proteica, quindi si tracciava una retta di taratura. Le concentrazioni dei campioni analizzati si ottenevano per estrapolazione della retta di taratura.

2.9 Elettroforesi delle proteine su gel denaturante di poliacrilammide (SDS-PAGE)

Il gel di poliacrilammide utilizzato era al 10% e conteneva 337 mM Tris/HCl, pH 8.8, 0.1% SDS, 10% acrilammide/Bis-acrilammide (soluzione *stock*: 38% acrilammide, 2% bis-acrilammide in H₂O). La parte superiore del gel conteneva 124 mM Tris/HCl, pH 6.8, 0.1% SDS, 5% acrilammide. I catalizzatori erano ammonio persolfato (APS) e Temed (Leammli, 1970).

I campioni si preparavano aggiungendo *sample buffer* di modo che la concentrazione finale fosse: 62 mM Tris/HCl pH 6.8, 1% glicerolo, 0.5% SDS, 0.5% 2-mercaptoetanol, 0.01% blu di bromofenolo. I campioni erano denaturati tramite incubazione a 95°C per 5 minuti.

Il gel veniva corso a 200 V in un tampone (0.2 M glicina, 25 mM Tris, 0.1% SDS). Il gel si colorava con una soluzione contenente 0.25% Comassie G, 25% isopropanolo, 10% acido acetico e si decolorava con una soluzione 10% acido acetico/25% isopropanolo.

2.10 Produzione del costrutto genico pPRO-EXHT-a-SsoUDGasi-a-His- tag

Per la produzione del costrutto genico pPRO-EXHTa-SsoUDGasi-a-*His-tag* codificante per SsoUDGasi-a con una coda di sei Istidine al N-terminale è stata effettuata una PCR sul DNA

gnomico di *S. solfataricus* amplificando il gene con il seguente programma: 1 min. a 94 °C; 1 min. a 50 °C; 1 min. a 72 °C (per 30 cicli) ed utilizzando i seguenti oligonucleotidi:

UDG-*NcoI*-for 5'-GTGTAGGTGTCCATGGATAACTTGGATCTTATTGCAGATGAG -3'

**UDG-*XhoI*-rev 5'-TGTGTGTGCTCGAGTTACTTGCCGCTGTTACTATTACCTTTTTCC
CC -3'**

Il prodotto ottenuto è stato digerito con gli enzimi di restrizione *NcoI/XhoI* e ligato (reazione di DNA ligasi per 16 h a temperatura ambiente) nel vettore di espressione pPRO-EX-HTa precedentemente linearizzato con i suddetti enzimi. Il gene clonato è stato sequenziato per escludere la presenza di mutazioni introdotte erroneamente durante la PCR.

2.11 Produzione dei mutanti della DNA pol B1

Dal gene DNA pol B1 sono stati ottenuti dei mutanti di delezione generati mediante le reazioni a catena della polimerasi (PCR); inserendo gli opportuni enzimi di restrizione mediante degli oligonucleotidi *primers*.

Le sequenze codificanti per i mutanti DNA pol B1-721; DNA pol B1-617; Nter sono stati generati mediante PCR usando come DNA stampo il costrutto pET 30a- DNA polB1 e come *primer 5'* l'oligonucleotide Nt-BamHI (5'-GGGTTTGGATCCGAATGACTAAGCAACTTACCTTA-3', contenente il sito di restrizione Bam HI); mentre come *primer 3'* per ciascun mutante sono stati utilizzati i seguenti oligonucleotidi rispettivamente

B1-721 Hind (5'-TTGGAAGCTTCTATGTTTCAGTCCAAATACACCGTA-3');

B1-617 Hind (5'-TTGGAAGCTTCTATCTCTTCTTCACTAACATCCCCTT-3');

Nt-Hind (5'-GGGTTTAAGCTTCTATTTTCGCTAAGATTTCTTCCTT-3')

contenenti tutti un codone di stop immediatamente a monte del sito di restrizione Hind III. È stata usata la DNA polimerasi Vent (NEB) ed il seguente programma: 4' a 94°C, 30'' a 94°C, 1' a 50°C, 3' a 72°C per 30 cicli.

I prodotti di PCR sono stati purificati con colonnine PCR Klean (BioRad), l'inserto ottenuto è stato diregito per 1 ora a 37°C con gli enzimi di restrizione Bam HI e Hind III (NEB). I prodotti della digestione sono stati caricati su gel di agarosio 1% e recuperati come descritto in precedenza.

L'inserto ottenuto è stato ligato con il vettore d'espressione di *E. coli* pTrcHis C (Invitrogen) precedentemente linearizzato con gli stessi enzimi di restrizione, utilizzando il Kit di ligasi rapida (Roche); per 3 ore a temperatura ambiente. Dopo aver eseguito una preparazione di DNA plasmidico dei vari costrutti, questi sono stati sequenziati (dal servizio di sequenziamento dell'I.G.B. Sequencing core) per verificare l'assenza di mutazioni spontanee introdotte dalla polimerasi durante la reazione di PCR.

Il gene C-ter è stato generato mediante PCR utilizzando come DNA stampo il costrutto pET30a-DNA pol B1 e come *primer* l'oligonucleotide Ct-EcoRI (5'-GGGTTTGAATCCCTCCTCTAATATAAGAACTTCT -3') come *primer* 5' (contenente il sito di restrizione EcoRI immediatamente a monte del codone codificante per il residuo 482) e l'oligonucleotide Ct-Xho come *primer* 3' (5'-GGGTTTCTCGAGGATTCCTTTACTTGGGTATGAAAA contenente il sito di restrizione Xho immediatamente dopo il codone di stop). Il prodotto di PCR è stato clonato nel vettore d'espressione pGEX-4T-2 (Amersham/Pharmacia Biosciences) precedentemente linearizzato con gli enzimi di restrizione EcoRI/XhoI (NEB) (per 1 ora a 37°C). Il plasmide ottenuto è stato chiamato pGEx-4T-Cter.

Per verificare che la sequenza fosse corretta, i costrutti ottenuti sono stati sequenziati (dal servizio di sequenziamento dell'I.G.B. Sequencing core).

2.12 Espressione e purificazione delle proteine ricombinanti

Cellule del ceppo di *E. coli* plysS-Rosetta (Novagen) sono state trasformate con il plasmide pET 30a- DNA polB1 (pTrcHisC-DNA pol B1-721; pTrcHisC-DNA pol B1-617, pTrcHisC-Nter; pGEX 4T-2-Cter; pPRO-EXHTa-SsoUDGasi-a-*His-tag*) e piastrate su terreno LB agar addizionato di 100 µg/ml di ampicillina e 30 µg/ml di cloramfenicolo. Le piastre sono state incubate per una notte a 37°C e il giorno seguente con una singola colonia si inoculano 500 ml di terreno LB contenente 30 µg/ml di cloramfenicolo e 100 µg/ml di ampicillina. Quando la coltura raggiungeva una densità di 0.7 OD a 600 nm, l'espressione della proteina DNA pol B1 intera è stata indotta mediante l'aggiunta di isopropil-β-D-tiogalattoside (IPTG) ad una concentrazione finale di 1 mM; mentre l'espressione di tutti i mutanti di delezione e dell'UDGasi è stata indotta ad una concentrazione finale di 0.2 mM IPTG. La coltura batterica è stata incubata a 37°C per altre 2 ore e poi centrifugata a 8000 rpm (Rotore GS-3 Sorvall) per 10'. I pellet cellulari venivano conservati a -20°C.

Lo stesso ceppo batterico è stato trasformato con il costrutto pET 21a-PolY1 8467 e piastrato su terreno LB agar addizionato di 100 µg/ml di carbenicillina e 30 µg/ml di cloramfenicolo. Le piastre sono state incubate per una notte a 37°C e il giorno seguente una singola colonia è stata inoculata in 500 ml di terreno LB contenente 30 µg/ml di cloramfenicolo e 100 µg/ml di carbenicillina. Quando la coltura raggiungeva una densità di 0.7 OD a 600 nm, l'espressione della proteina è stata indotta mediante l'aggiunta di (IPTG) ad una concentrazione finale di 1 mM. La coltura batterica è stata incubata a 37°C per altre 2 ore e poi centrifugata a 8000 rpm (Rotore GS-3 Sorvall) per 10'. I pellet cellulari venivano conservati a -20°C.

La purificazione di DNA pol B1 (N-ter) è stata ottenuta risospendendo il *pellet* batterico in 10 ml di buffer A (20 mM Tris/HCl pH 8.0, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50 mM NaCl) in cui sono stati precedentemente sciolti gli inibitori di proteasi (50µg/ml fenil-metil-sulfonil fluoruro, 0.2 µg/ml

benzamidina, 1 µg/ml aprotinina). Le cellule sono state successivamente lisate attraverso due passaggi consecutivi nella French Press (Aminco Co., Silver Spring, MD) a 1500 p.s.i. Il lisato così ottenuto è stato ultracentrifugato per 30' a 30000 rpm (Rotore Sorvall 70.0Ti) a 10°C. Il sovrantante proveniente dalla centrifugazione è stato trattato al calore (termoprecipitazione) per 15' a 70°C ed incubato in ghiaccio per 10'. Le proteine così termoprecipitate, sono state rimosse mediante ultracentrifugazione a 30000 rpm per 30' (Rotore Sorvall 70.0 Ti) a 10°C. Il sovrantante è stato recuperato, filtrato con un filtro da 0.22 µm (Millipore) e caricato su una colonnina “*Ni⁺-NTA chelate agarose superflow*” (Qiagen) pre-equilibrata in buffer A. Dopo aver lavato la resina con 100 ml di buffer A, l’eluizione è stata eseguita mediante gradiente di imidazolo (10-500 mM) in buffer A con l’aggiunta del 20% di glicerolo. Le frazioni raccolte (1 ml) sono state analizzate per SDS-PAGE e quelle contenenti la proteina ricombinante DNA pol B1 sono state riunite, dializzate contro buffer B (20 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 mM DTT, 300 mM NaCl, 20% Glicerolo) per 16 ore a 4°C, concentrate su un sistema centricon YM 50 e conservate a -80°C. 500 µl delle due preparazioni sono state successivamente dializzate contro un Buffer C (20 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 mM DTT, 200 mM NaCl).

La purificazione della UDGas-a veniva condotta in maniera molto simile eccetto che per la differente composizione dei Buffers. Il *pellet* è stato infatti risospeso in un buffer A (25 mM Tris/HCl pH 8.0, 2.5 mM MgCl₂, 200 mM NaCl, 5 mM imidazolo). Un'altra differenza è la temperatura della termoprecipitazione che è stata condotta a 65°C. Tale purificazione veniva effettuata mediante un ulteriore passaggio cromatografico (dopo la colonnina “*Ni⁺-NTA chelate agarose superflow*”) che prevedeva l’uso di una colonna ad esclusione molecolare Superdex 200 HR 16/60 (GE Healthcare), con un buffer B (25 mM Tris/HCl pH 8.0, 2.5 mM MgCl₂, 200 mM NaCl).

La proteina Cter è stata purificata seguendo una differente procedura in quanto è stata prodotta come proteina di fusione con GST. Il *pellet* proveniente da 500 ml di crescita è stato risospeso in 20

ml del buffer A (20 mM Tris/HCl pH 8.0; 0.1 mM EDTA; 1 mM DTT; 150 mM NaCl; 5 mM MgCl₂, 0.1% Tween) in cui sono stati precedentemente sciolti gli inibitori di proteasi. Le cellule sono state successivamente lisate attraverso due passaggi consecutivi nella French Press a 1500 p.s.i. Il lisato cellulare è stato ultracentrifugato per 30' a 30000 rpm (Rotore Sorvall 70.0Ti) a 10°C. Il sovrnatante è stato filtrato con un filtro da 0.22 µm (Millipore) e aggiunto a 3 ml di resina Glutathione Sepharose 4B (Amersham/Pharmacia Bioscience) precedentemente equilibrata nel buffer A. Tale miscela è stata incubata in ghiaccio per un'ora con agitazione. Dopo aver lavato la resina con 45 ml di tampone A si procedeva all'eluizione della proteina mediante 3 passaggi con Glutathione ridotto 10 mM. Le frazioni raccolte sono state dializzate contro un buffer B (20 mM Tris/HCl pH 8.0, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.1% Tween) per 16 ore a 4°C e conservate poi a -20°C.

La purificazione di DNA polB1 -721 è stata ottenuta risospendendo il *pellet* batterico in 10 ml di buffer A (20 mM Tris/HCl pH 8.0, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 100 mM NaCl) in cui sono stati precedentemente sciolti gli inibitori di proteasi. Le cellule sono state successivamente lisate attraverso due passaggi consecutivi nella French Press (Aminco Co., Silver Spring, MD) a 1500 p.s.i. Il lisato così ottenuto è stato ultracentrifugato per 30' a 30000 rpm (Rotore Sorvall 70.0Ti) a 10°C. Il sovrnatante proveniente dalla centrifugazione è stato trattato al calore (termoprecipitazione) per 10' a 70°C ed incubato in ghiaccio per 10'. Le proteine così termoprecipitate, sono state rimosse mediante centrifugazione a 30000 rpm per 30' (Rotore Sorvall 70.0 Ti) a 10°C. Il sovrnatante è stato recuperato, filtrato con un filtro da 0.22 µm (Millipore) e caricato su una colonnina “Ni²⁺-NTA chelate agarose superflow” (Qiagen) pre-equilibrata in buffer A. Dopo aver lavato la resina con 100 ml di buffer A, l'eluizione è stata eseguita mediante gradiente di imidazolo (10-500 mM, con un lavaggio prolungato dello step a 10 mM imidazolo) in buffer A. Le frazioni raccolte (1 ml) sono state analizzate per SDS-PAGE e quelle contenenti la proteina ricombinante DNA polB1-721 sono state riunite, dializzate contro buffer B (20 mM Tris pH 8.0, 1 mM DTT, 200 mM NaCl) per 16 ore a 4°C e conservate a -20°C.

La purificazione di DNA polB1 -617 è stata ottenuta risospendendo il *pellet* batterico in 10 ml di buffer A (25 mM Tris/HCl pH 8.5, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50 mM NaCl) in cui sono stati precedentemente sciolti gli inibitori di proteasi. Le cellule sono state successivamente lisate attraverso due passaggi consecutivi nella French Press (Aminco Co., Silver Spring, MD) a 1500 p.s.i. Il lisato così ottenuto è stato ultracentrifugato per 30' a 30000 rpm (Rotore Sorvall 70.0Ti) a 10°C. Il sovrnatante proveniente dalla centrifugazione è stato trattato al calore (termoprecipitazione) per 10' a 65°C ed incubato in ghiaccio per 10'. Le proteine così termoprecipitate, sono state rimosse mediante centrifugazione a 30000 rpm per 30' (Rotore Sorvall 70.0 Ti) a 10°C. Il sovrnatante è stato recuperato, filtrato con un filtro da 0.22 µm (Millipore) e caricato su una colonna di scambio anionico *Mono Q HR 10/10* (ammonio quaternario) (Amersham Pharmasia). La colonna è stata sviluppata con un gradiente lineare di NaCl (0-1 M). Le frazioni raccolte (1 ml) sono state analizzate per SDS-PAGE e quelle contenenti la proteina ricombinante sono state riunite, dializzate contro buffer B (10 mM Tris/HCl pH 8.5, 2.5 mM MgCl₂) per 16 ore a 4°C e caricate sul una colonna di affinità *Heparin sepharose*TM 6 *Fast flow* (5ml). L'eluizione è stata eseguita applicando alla colonna un gradiente lineare di NaCl (0-1 M). Le frazioni raccolte sono state dializzate contro un Buffer C (20 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 mM DTT, 200 mM NaCl) per 16 ore a 4°C, concentrate su un sistema centricon YM 30 e conservate a -20°C.

DNA PolY1 è stata purificata risospendendo il *pellet* cellulare con 20 ml di Buffer A (50 mM Tris/HCl pH 7.5; 5 mM MgCl₂) in cui sono stati disciolti 30 µl di DNasi, 10 µl di RNasi e gli inibitori di proteasi. Le cellule sono state poi lisate attraverso tre passaggi consecutivi nella French Press (Aminco Co., Silver Spring, MD) a 1500 p.s.i. Al lisato così ottenuto sono stati aggiunti 30mg/ml di Protamina Solfato ed incubato in ghiaccio per 30'. Il campione è stato centrifugato per 30' a 30000 rpm (Rotore Sorvall 70.0Ti) a 10°C. Il sovrnatante proveniente dalla centrifugazione è stato trattato al calore (termoprecipitazione) per 20' a 70°C ed incubato in ghiaccio per 10'. Le proteine così termoprecipitate, sono state rimosse mediante centrifugazione a 30000 rpm per 30' (Rotore Sorvall 70.0 Ti) a 10°C. Il sovrnatante è stato recuperato, filtrato con

un filtro da 0.22 μm (Millipore) e caricato su una colonna di affinità *Heparin sepharose*TM 6 *Fast flow* (7ml) preequilibrata in Buffer A, connessa ad un sistema AKTA (Amersham Biosciences). L'eluizione della proteina è stata effettuata applicando un gradiente lineare di NaCl (0-1 M ad una velocità di flusso di 1 ml/min). Le frazioni analizzate per SDS-Page e contenenti la proteina sono state riunite e dializzate in un Buffer C (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 5 mM MgCl₂, 50 mM NaCl) per 16 ore a 4°C. Il campione è stato poi concentrato con un sistema Amicon su una membrana con *cut-off* di 30000 e conservato a -20°C.

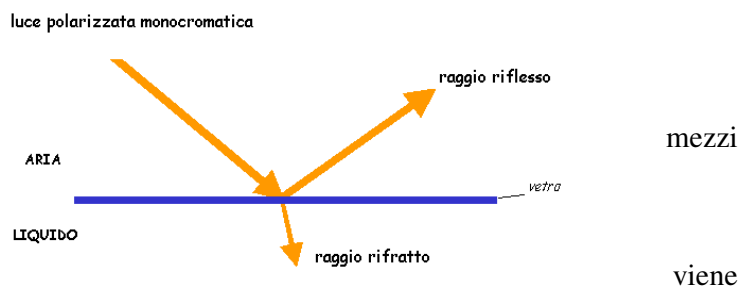
2.13 Surface Plasmon Resonance (SRP)

Il BIACORE è un apparecchio di analisi di interazioni tra biomolecole in tempo reale, basato sul principio della Surface Plasmon Resonance (SPR), esso è in grado di:

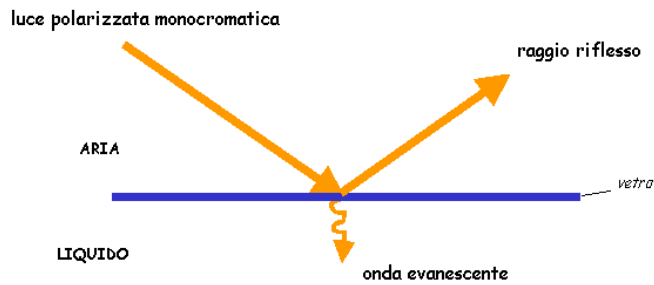
Misurare la velocità di associazione e dissociazione delle interazioni e di determinante le costanti

Misurare la concentrazione delle biomolecole nel campione

Quando un fascio di luce polarizzata monocromatica illumina l'interfaccia tra due mezzi con indici di rifrazione distinti, una parte della luce



riflessa, mentre un'altra parte viene rifratta. Qualora non ci sia rifrazione, una delle componenti elettromagnetiche della luce, l'onda evanescente, si propaga perpendicolare all'interfaccia per una distanza equivalente alla sua lunghezza d'onda. La zona attraversata dall'onda viene chiamata campo evanescente. Se un fine letto di metallo, ricco di elettroni liberi è depositato all'interfaccia, questo entra in risonanza con i fotoni del fascio incidente. Questo fenomeno è chiamato Surface Plasmon Resonance.

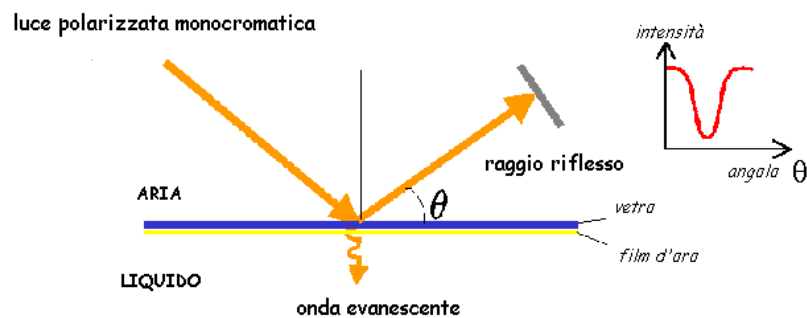


Una delle conseguenze energetiche di questa risonanza è visibile nel fascio riflesso che, analizzato da una serie di diodi, presenta un decadimento di intensità a un angolo definito.

L'angolo di intensità minimo è l'angolo di risonanza, che varia in funzione dell'indice di rifrazione del mezzo presente nel campo evanescente. Il sistema di rilevamento ottico del BIAcore è calibrato in modo che il fascio incontri l'interfaccia biospecifica in condizioni di riflessione interna totale. La lunghezza

d'onda della
è di 760 nm.

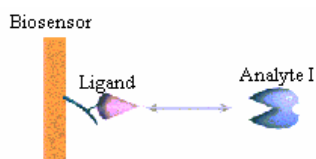
Il BIAcore ha
funzione di
monitorare le



luce

la

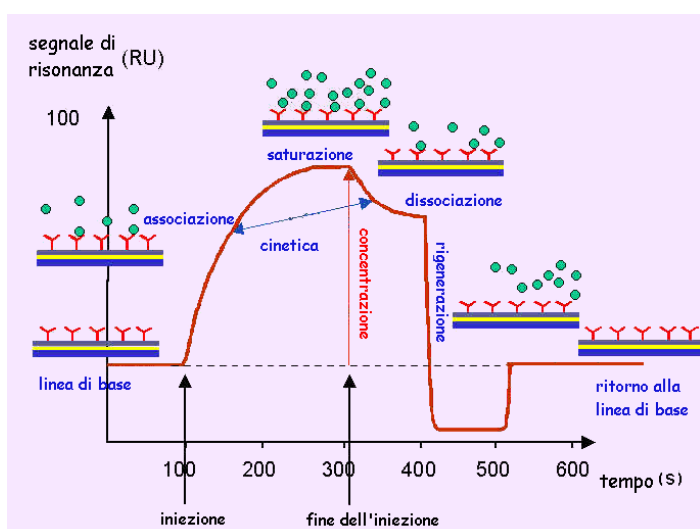
interazioni tra biomolecole in un flusso continuo di tampone. Uno dei reagenti (ligando) è trattenuto in modo specifico su un interfaccia (*sensorchip*). I *sensorchip* più comuni sono costituiti da un supporto di vetro ricoperto da un sottile letto d'oro ed un idrogel reticolato di destrano-carbossimetilato. Sulla superficie vengono immobilizzati covalentemente ligandi idrosolubili in un mezzo idrofilo.



L'altro *partner* (analita), diluito nel tampone HBS-EP BIAcore (0.01 M Hepes pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3mM EDTA, 0.005% polisorbato 20), è iniettato con un flusso costante sul *sensorchip*. L'associazione

o la dissociazione dei complessi modifica la rifrangenza del mezzo e varia l'angolo di risonanza θ . La registrazione delle variazioni di θ permette di seguire la formazione del complesso sul *sensorchip*. Il segnale è espresso in Unità di Risonanza (RU). Una variazione di 1000 RU equivale ad una variazione di θ di 0,1 gradi ed alla associazione di 1ng di proteina per mm^2 di superficie.

La linea di base all'inizio dell'esperimento corrisponde ad un flusso di tampone sulla matrice



associata al ligando. Quando l'analita viene iniettato, la formazione del complesso è seguita per mezzo dell'aumento della massa nell'intorno della superficie. La dissociazione si verificherà non appena il tampone rimpiazza l'analita.

L'ultima tappa consiste nella rigenerazione della superficie per rimuovere completamente ogni complesso e ritornare alla linea di base.

Le prove di interazione sono state effettuate usando il BIAcore 2000 (Biosciences). Circa 200 pmol della proteina DNA pol Y1 sono state immobilizzate su un *sensorchip* CM5 in 10 mM NaAc pH 5.0; mentre su un nuovo *chip* abbiamo immobilizzato 45 pmol della DNA pol B1 in 10 mM NaAc pH 3.6. Sono state iniettate con un flusso di 30 μ l/min quantità crescenti delle varie proteine nel buffer standard HBS-EP (0.01 M Hepes pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3mM EDTA, 0.005% polisorbato 20) sulla superficie del *chip*. Tutti i saggi sono stati effettuati ad una temperatura di 25°C.

Il sensorgramma è stato analizzato usando il BIAevaluation software (BIAcore).

2.14 Immunoprecipitazione

250 mg di *Protein A SepharoseTM CL-4B* (Amersham Biosciences) sono stati lavati con H₂O bidistillata e risospesi in 1 ml di Buffer A (50 mM Tris/HCl pH 7.0, 40 mM NaCl, 20 mM MgCl₂; 2.5 mM β -Mercaptoetanolo)

A 500 μ l di Resina sono stati aggiunti 100 μ l dell'anticorpo policlonale α -DNA polY1 e lasciati in agitazione per 16 ore. La resina coniugata è stata lavata con 10 volumi di buffer A per allontanare l'anticorpo in eccesso. Successivamente la resina è stata risospesa in 500 μ l dello stesso Buffer.

Contemporaneamente sono state preparate 2 reazioni (volume finale 40 μ l) contenenti 90 pmol di DNA pol B1, ad una reazione sono stati aggiunti 150 pmol di DNA pol Y1 e Buffer A, nella seconda è aggiunto solo il Buffer A, questa reazione costituirà il controllo negativo. Alle reazioni sono aggiunti 80 μ l di resina coniugata (40 μ l di resina depositata). Le reazioni sono lasciate in agitazione ad interagire per 1 ora a temperatura ambiente. I campioni sono poi lavati con 5 ml di Buffer di lavaggio (50 mM Tris/HCl pH 7.0, 300 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM MgCl₂) su colonnine MicroBio-Spin Chromatography Columns (BioRad). La resina è stata poi risospesa in 60 μ l di *sample buffer* di modo che la concentrazione finale fosse: 62 mM Tris/HCl pH 6.8, 1% glicerolo, 0.5% SDS, 0.5% 2-mercaptoetanolo, 0.01% blu di bromofenolo. I campioni sono poi corsi su gel denaturante al 10%.

È stata poi effettuata un'analisi per Western Blot utilizzando una membrana PVDF (Polivinilidene Fluoruro). La membrana è stata incubata per 1 ora nel Blocking Buffer (10 mM Tris/HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 3% BSA, 0.1 % Tween 20) e tagliata in 2 metà. La metà superiore del filtro è stata lavata 3 volte con TBS (10 mM Tris/HCl pH 7.5, 150 mM NaCl) ed incubata per 1 ora con l'anticorpo *Anti-His HRP coniugato* con per ossidasi di rafano (Quiagen) diluito 1/1000 nel Blocking Buffer. L'anticorpo riconosce le 6 istidine al N-terminale della Pol B1. L'interazione antigene-anticorpo sono detectate con il Kit ECL⁺ (chemiluminescenza elettrogenerata) (Amersham

Biosciences). La chemiluminescenza è stata analizzata usando un sistema Chemi Doc 2000 mediante il software Quantity One (Bio-Rad Laboratories). La metà inferiore del filtro è stata lavata 3 volte con TBS-T (10 mM Tris/HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 10% Tween 20) ed incubato per 1 ora con l'anticorpo policlonale α -DNA polY1 diluito 1/1000 nel TBS-T. L'anticorpo riconosce la DNA pol Y1. Le interazioni antigene anticorpo sono state detectate con un anticorpo secondario coniugato alla fosfatasi alcalina (AP).

2.15 Saggi di attività UDGasica

Per i saggi di legame al DNA sono stati utilizzati i seguenti oligonucleotidi:

molecole di DNA sia a singolo che a doppio filamento, contenenti una base modificata (Uracile) al centro della sequenza. La molecola di DNA a singolo filamento era rappresentata da un oligonucleotide di 32 basi (32mer-U) marcato all'estremità 5'. I substrati a doppio filamento erano ottenuti ibridando a tale oligonucleotide i diversi filamenti complementari riproducendo i quattro mismatch (U-A; U-G; U-T; U-C).

5'-TTGCATGCCTGCAGGT(U)GACTCTAGAGGATCC-3' (32mer-U)

5'-AACGTACGGACGTCCA(A)CTGAGATCTCCTAGG-3' (32mer-A)

5'-AACGTACGGACGTCCA(G)CTGAGATCTCCTAGG-3' (32mer-G)

5'-AACGTACGGACGTCCA(C)CTGAGATCTCCTAGG-3' (32mer-C)

5'-AACGTACGGACGTCCA(T)CTGAGATCTCCTAGG-3' (32mer-T).

La molecola di DNA utilizzata come singolo filamento è stata 32mer-U marcata.

Tale molecola è stata marcata con [γ -³²P]ATP utilizzando la T4 polinucleotide chinasi (*New England Biolabs*) e purificate utilizzando il sistema Micro Bio Spin P-30 (*Bio-Rad Laboratories*).

Per preparare le molecole di DNA a doppio filamento, le miscele contenenti gli oligonucleotidi sintetici complementari sono state incubate per 5 min. a 95 °C e poi raffreddate lentamente fino a raggiungere la temperatura ambiente.

I saggi di attività UDGasica sono stati effettuati in reazioni di 20µl contenenti 200 fmoli delle molecole di DNA marcate con [γ -³² P]ATP in 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM DTT, e la quantità proteica indicata. Le miscele sono state incubate a 55°C per 10 min. Ad ogni reazione sono stati successivamente aggiunti 2µl di 1 M NaOH, quindi sono state denaturate per 10' a 99°C e sono state neutralizzate con 1µl di 1 M TRIS non (pHato). Infine le miscele sono state bloccate aggiungendovi 5µl una STOP Solution 5X (97.5% FORMALDEIDE; 10 mM EDTA pH 7.5; 0.3% Xilenecianolo e 0.3% Blu di Bromofenolo) e sottoposte ad elettroforesi nativa su gel al 20% (poliacrilammide/bis in un rapporto 19:1) in 1x TBE (TBE 1X: 100 mM Tris, 2 mM EDTA, 80 mM acido borico) e 6 M UREA, a voltaggio costante di 100 Volts. Le bande radioattive sono state rilevate utilizzando il PhosphorImager.

2.16 Cromatografia ad esclusione molecolare

Lo stato oligomerico di SsoUDGasi-a (100 µg in 250 µl) è stato analizzato per cromatografia ad esclusione molecolare utilizzando una colonna Superdex 200 HR 10/30 (*Amersham Biosciences*). La colonna è stata sviluppata in *buffer* (25 mM Tris-HCl pH 8.0, 2.5 mM MgCl₂, 200 mM NaCl). La calibrazione della colonna è stata effettuata utilizzando i marcatori di peso molecolare: BSA (69 kDa), ovalbumina (44kDa) e la ribonucleasi A (13.7 kDa) (*Amersham Biosciences*). La cromatografia è stata eseguita con un flusso di 0.3 ml/min. a temperatura ambiente.

3. Risultati

La descrizione dei risultati ottenuti è suddivisa in due parti.

Nella prima parte riporto i dati riguardanti la produzione e la caratterizzazione biochimica di SsoUDGasi-a. Lo scopo è stato quello di analizzare l'attività di tale enzima su molecole di DNA sia a singolo che a doppio filamento, contenenti uracile. Inoltre abbiamo analizzato l'interazione fra questa proteina e altri fattori coinvolti sia nella Replicazione che nella Riparazione del DNA (SsoPol-B1 e SsoPol-Y1).

Nella seconda parte, invece, abbiamo analizzato in dettaglio l'interazione fra la SsoPol-B1 e la SsoPol-Y1, determinando la regione minima di contatto fra le due proteine attraverso tecniche di immunoprecipitazione e mediante tecniche di SPR.

3.1 Produzione di SsoUDGasi-a e analisi dello stato oligomerico

Prima di analizzare lo stato oligomerico dell'enzima SsoUDGasi-a abbiamo prodotto la proteina ricombinante effettuando un taglio al calore dell'estratto proteico di *E. coli* (dopo aver trasformato le cellule con il plasmide contenente il gene dell'UDGasi-a e aver indotto l'espressione dell'enzima), quindi abbiamo effettuato una cromatografia di affinità (*Ni⁺-NTA chelate agarose superflow*) seguita da una cromatografia ad esclusione molecolare (Superdex 200 HR 16/60; vedi paragrafo 2.12).

Per verificare lo stato oligomerico di SsoUDGasi-a abbiamo effettuato una cromatografia ad esclusione molecolare di tipo analitico.

Tale analisi è stata condotta mediante l'utilizzo di una colonna Superdex 200 HR 10/30 analitica, opportunamente calibrata con proteine di riferimento (Paragrafo 2.16). L'analisi ha evidenziato che

il profilo di eluizione di SsoUDGasi-a (come mostrato in Figura 3.1) è corrispondente ad un peso molecolare di circa 28 kDa. Questi risultati suggeriscono che l'enzima è un monomero in soluzione.

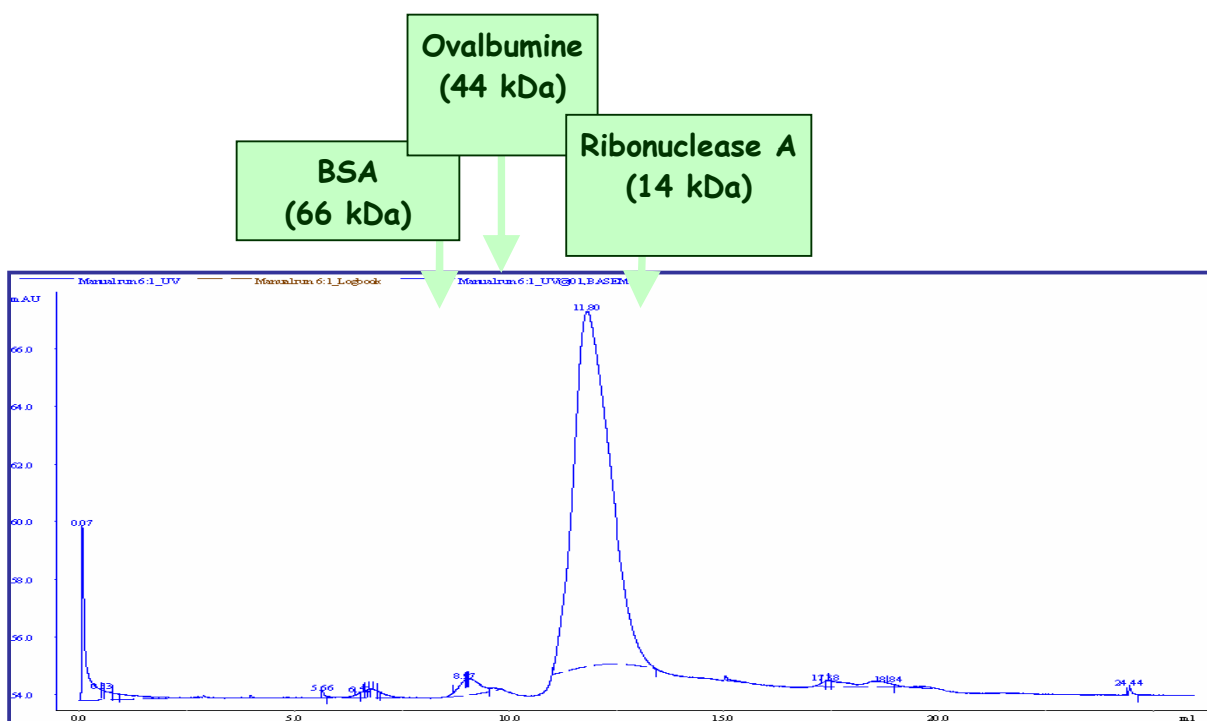


Fig.3.1 Gel filtrazione analitica di SsoUDGasi-a. SsoUDGasi-a (100 µg in 250 µl) sono stati sottoposti a gel filtrazione analitica su colonna Superdex 200. Le frecce indicano i volumi di eluizione dei marcatori di peso molecolare utilizzati per calibrare la colonna.

3.2 Attività di SsoUDGasi-a

Dopo aver verificato che l'enzima è un monomero in soluzione, abbiamo testato l'attività della proteina su DNA sia a singolo che a doppio filamento, contenente uracile.

I risultati ottenuti rivelano che l'enzima è in grado di idrolizzare l'uracile presente sia su un singolo filamento di DNA, sia su un doppio filamento di DNA che mimica i quattro mismatch (U-A; U-G;

U-T; U-C). Inoltre i risultati mostrano anche che l'enzima preferisce il substrato a doppio filamento di DNA che contiene il mismatch U-C (Figura 3.2).

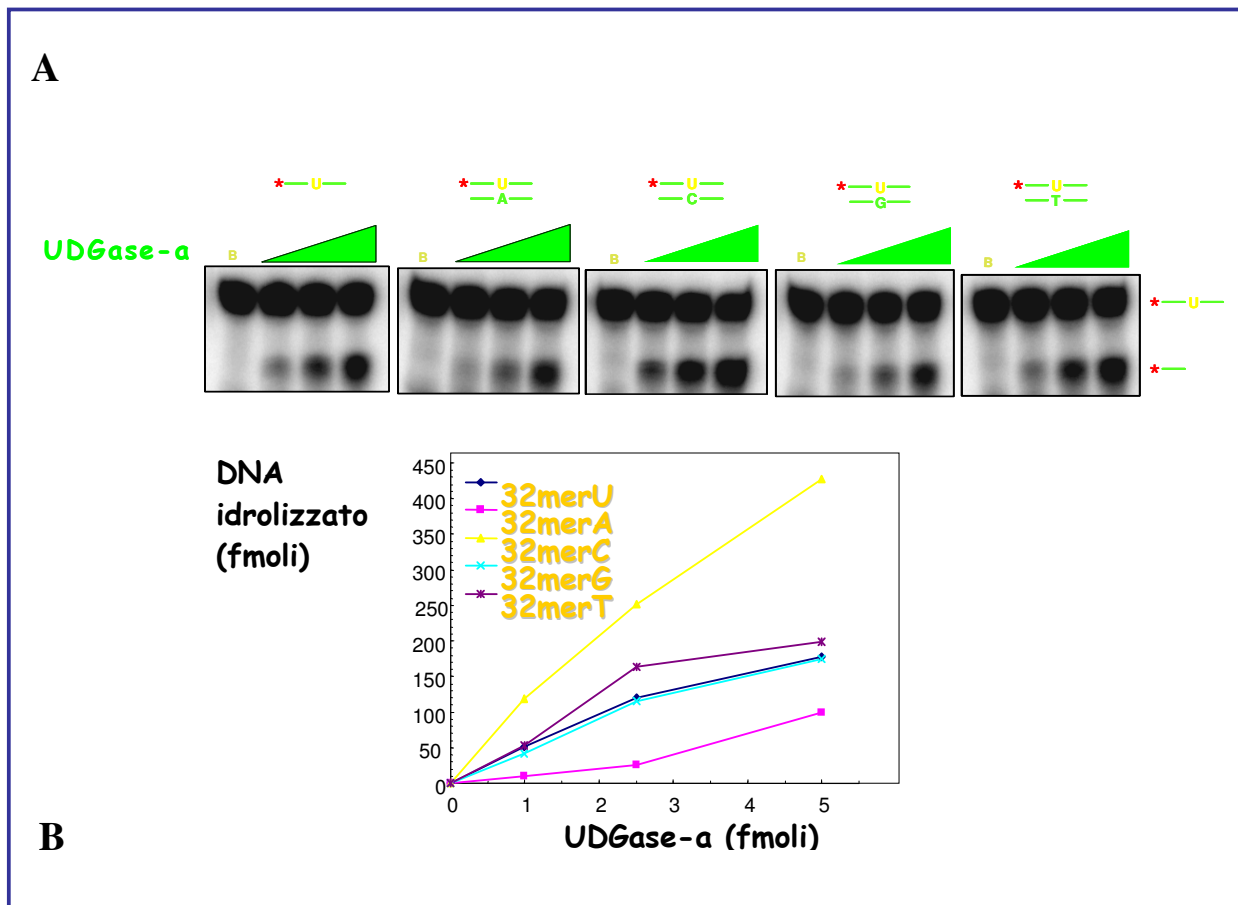


Fig. 3.2. Saggi di attività di SsoUDGase-a. A, saggi UDGasici di SsoUDGase-a con quantità crescenti di proteina (1, 2.5 e 5 fmoli di enzima). B, grafico ottenuto riportando la quantità di DNA idrolizzato (%) negli esperimenti UDGasici contro la quantità di proteina utilizzata (fmoli) con DNA a singolo e doppio filamento. Il DNA idrolizzato è stato quantizzato mediante analisi al PhosphorImager.

3.3 Purificazione delle DNA polimerasi pol B1 e pol Y1 di *S.solfataricus*

La proteina DNA pol B1 è stata prodotta in *E. coli* come proteina ricombinante solubile con una coda di 6 residui di istidina all'estremità amminotermine. La DNA pol B1 è particolarmente sensibile al taglio proteolitico all'estremità N-terminale, ma la presenza della coda di istidine la rende più stabile in soluzione. Essa è stata purificata utilizzando procedure che includono un

trattamento al calore dell'estratto cellulare ed un passaggio cromatografico su una colonnina Ni^{+} -NTA *chelate*, come descritto nei Materiali e Metodi (fig. 3.3).

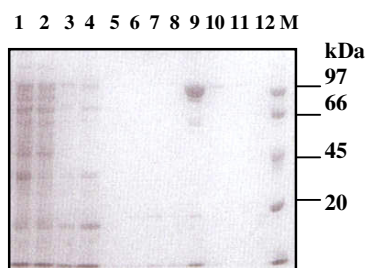


Fig. 3.3 Purificazione di DNA pol B1. SDS-PAGE della DNA pol B1 estratto cellulare (linea 1), estratto cellulare trattato al calore (linea 2), rifiutato dalla colonna Ni^{+} -NTA (linea 3), frazioni di lavaggio (linea 4), frazioni eluite (linea 5-11), Marcatori di peso molecolare (M)

DNA pol Y1, anch'essa prodotta in *E. Coli* come proteina ricombinante, è stata purificata per cromatografia di affinità su *Heparin sepharose*, dopo un trattamento al calore dell'estratto cellulare (fig. 3.4)

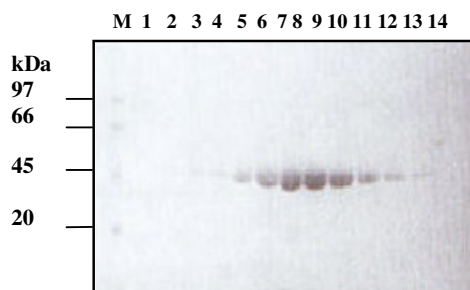


Fig. 3.4 Purificazione di DNA pol Y1. SDS-PAGE della DNA pol Y1 Marcatori di peso molecolare (linea M), frazioni eluite dalla colonna di eparina (linea 1-14)

Come si può osservare nelle figure 3.3 e 3.4 entrambe le proteine sono state purificare all'omogeneità. Le frazioni contenenti la proteina di interesse sono state riunite ed il campione così

ottenuto è stato concentrato (DNA pol B1 0.8 mg/ml, DNA pol Y1 2.2 mg/ml). Aliquote di 20 μ l sono state conservate a -20° C.

3.4 Analisi dell'interazione fra Sso pol B1 e Sso pol Y1 mediante SPR

Per analizzare le interazione fisica tra DNA pol B1 e DNA pol Y1 è stata utilizzata la tecnica SPR, un metodo di trasduzione ottica molto sensibile in grado di rilevare interazioni molecolari in tempo reale. Una macromolecola (ligando) può essere immobilizzata su una superficie metallica su cui viene fatto fluire un analita in soluzione. Se questo è riconosciuto dal ligando, si forma un complesso. La formazione di tale complesso modifica le proprietà dell'onda evanescente, o in altre parole modificherà l'indice di rifrazione del mezzo. La derivante variazione dell'angolo di risonanza (θ) è direttamente proporzionale alla quantità di analita legato al ligando. Il lettore ottico del biosensore misura lo spostamento dell'angolo θ . I dati sono presentati in tempo reale in un grafico chiamato sensorgramma.

Quantità crescenti della proteina DNA pol B1 (analita) sono state iniettate su un *sensorchip* su cui erano state precedentemente immobilizzate 200 pmol di Sso PolY1 (fig 3.5).

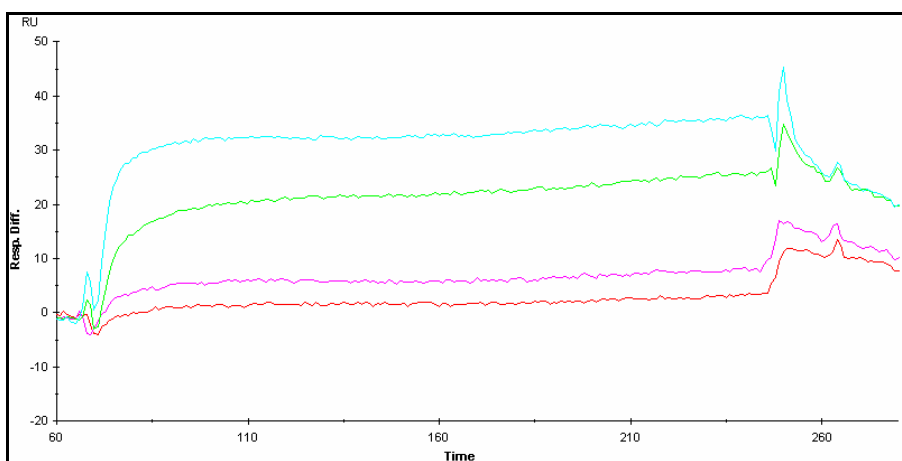


Fig 3.5 sensorgramma DNA pol B1. Il ligando è la DNA pol Y1. 30 (rosso), 60 (magenta), 120 (verde), 240 (azzurro) pmol dell'analita PolB1 sono flussati sul chip.

Le curve del sensorgramma crescono proporzionalmente alla quantità di analita iniettato, suggerendo una interazione tra la DNA pol B1 e DNA pol Y1. Per confermare la veridicità del risultato ottenuto, ho deciso di usare la DNA pol B1 (45 pmol) come ligando e quantità crescenti di analita DNA pol Y1.

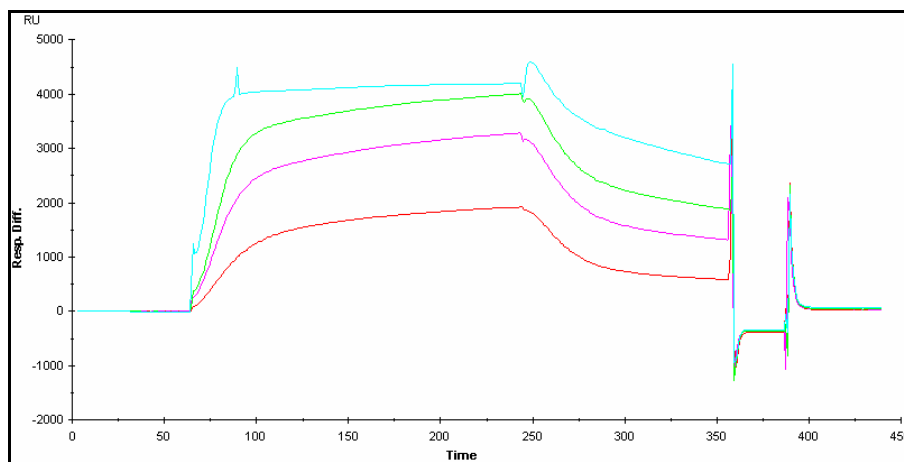


Fig 3.6 sensorgramma DNA pol Y1. Il ligando è la DNA pol B1. 55 (rosso), 110 (magenta), 220 (verde), 440 (azzurro) pmol di PolY1 sono flussati sul chip.

Anche in questo caso si osservano curve che crescono all'aumentare della quantità di analita flussato (fig 3.6).

3.5 Immunoprecipitazione di Sso pol B1 e Sso pol Y1

L'interazione tra le due DNA polimerasi è stata confermata anche con un esperimento di immunoprecipitazione. 90 pmol di DNA pol B1 sono stati aggiunti a 155 pmol di DNA Pol Y1 o ad un opportuno buffer (vedi Materiali e Metodi) (controllo negativo). Le miscele così ottenute erano incubate per 10 minuti a temperatura ambiente. Successivamente alle miscele era aggiunta *Protein A Sepharose*, precedentemente coniugata con degli anticorpi policlonali anti-PolY1 (vedi Materiali e Metodi). Dopo aver rimosso le proteine non legate alla resina mediante lavaggi con un opportuno buffer (vedi Materiali e Metodi), i campioni erano analizzati mediante elettroforesi su SDS/poliacrilammide e trasferimento su membrana PVDF (Polivinilidene Fluoruro). La DNA pol

B1 era rilevata su filtro grazie all'uso di anticorpi anti-His coniugati con la perossidasi di rafano e utilizzando il sistema ECL⁺ (chemiluminescenza elettrogenerata). Come si può vedere dalla fig 3.7 è presente una banda relativa alla DNA pol B1 solo nelle reazioni in cui la DNA polB1 era stata aggiunta alla DNA pol Y1.

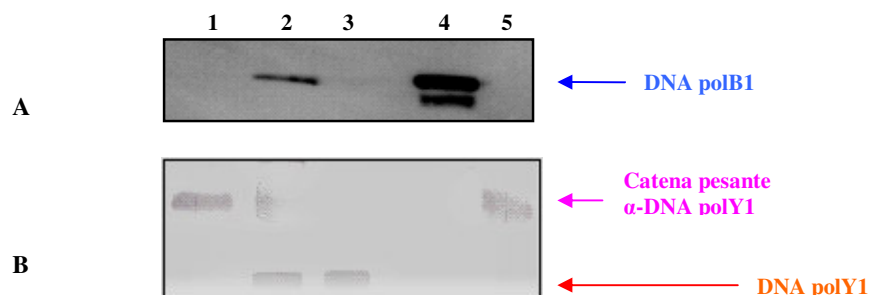


Fig 3.7 Western Blot. controllo negativo (linea 1), DNA pol B1+DNA pol Y1 (linea 2), controlli DNA pol Y1 (linea 3), DNA pol B1 (linea 4), resina α-DNA polY1 (linea 5). A: filtro sviluppato con anticorpi anti-His coniugati con la perossidasi di rafano ed ECL⁺. B: filtro sviluppato con un anticorpo secondario coniugato con fosfatasi alcalina.

Il risultato dell'immunoprecipitazione confermava l'interazione fisica tra le due DNA polimerasi.

3.6 Analisi dell'interazione fra il complesso Sso polB1-polY1 e l'SsoUDGasi-a

Per analizzare l'interazione fisica tra il complesso SsoPol-B1-Pol-Y1 e l'UDGasi-a è stata utilizzata ancora una volta la tecnica SPR.

Quantità crescenti del complesso proteico SsoPolB1-PolY1 (analita) sono state iniettate su un *sensorchip* su cui erano state precedentemente immobilizzate 200 pmol di SsoUDGasi-a (fig 3.8).

Le curve del sensorgramma crescono proporzionalmente alla quantità di analita iniettato, suggerendo una interazione tra il complesso delle polimerasi e l'UDGasi-a. Per confermare la veridicità del risultato ottenuto, ho deciso di usare la tecnica del *binding* sequenziale.

Una quantità fissa della SsoPolB1 ed una quantità fissa di SsoUDGasi-a (analiti) sono state iniettate separatamente e in maniera sequenziale su un *sensorchip* su cui erano state precedentemente

immobilizzate 200 pmol di SsoPolY1. L'andamento della curva così ottenuta rivela che la SsoPolB1 interagisce con la SsoPolY1 e che la SsoUDGasi-a può interagire solo con il complesso già formato.

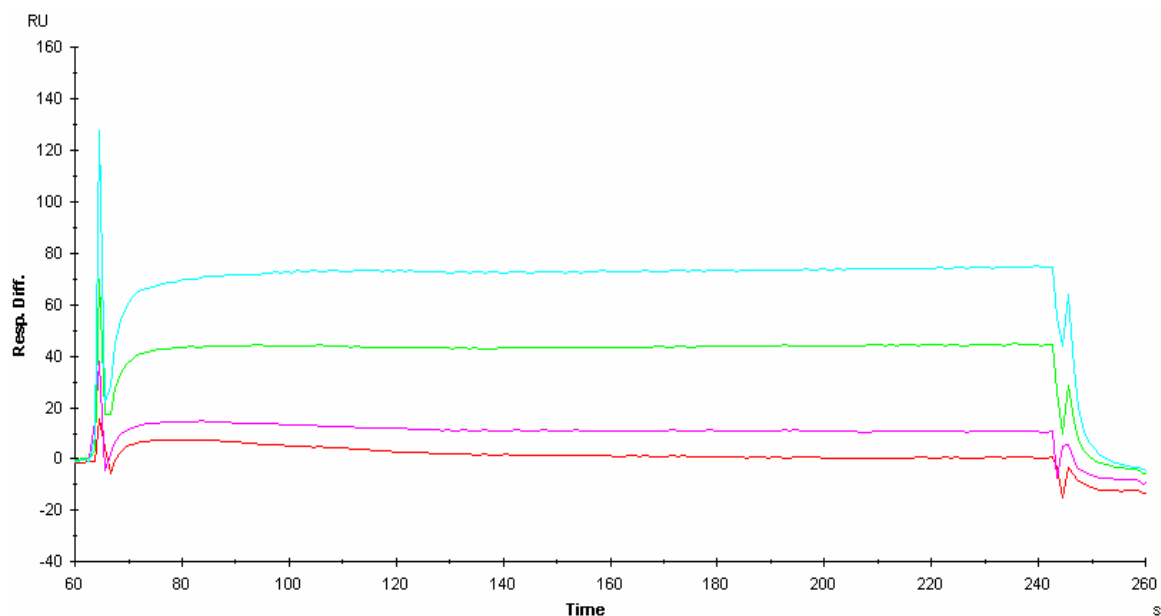


Fig 3.8 sensorgramma DNA pol B1-pol Y1. Il ligando è la UDGasi-a. 55 (rosso), 110 (magenta), 220 (verde). 440 (azzurro) nmol totali del complesso PolB1-PolY1 sono flussati sul chip.

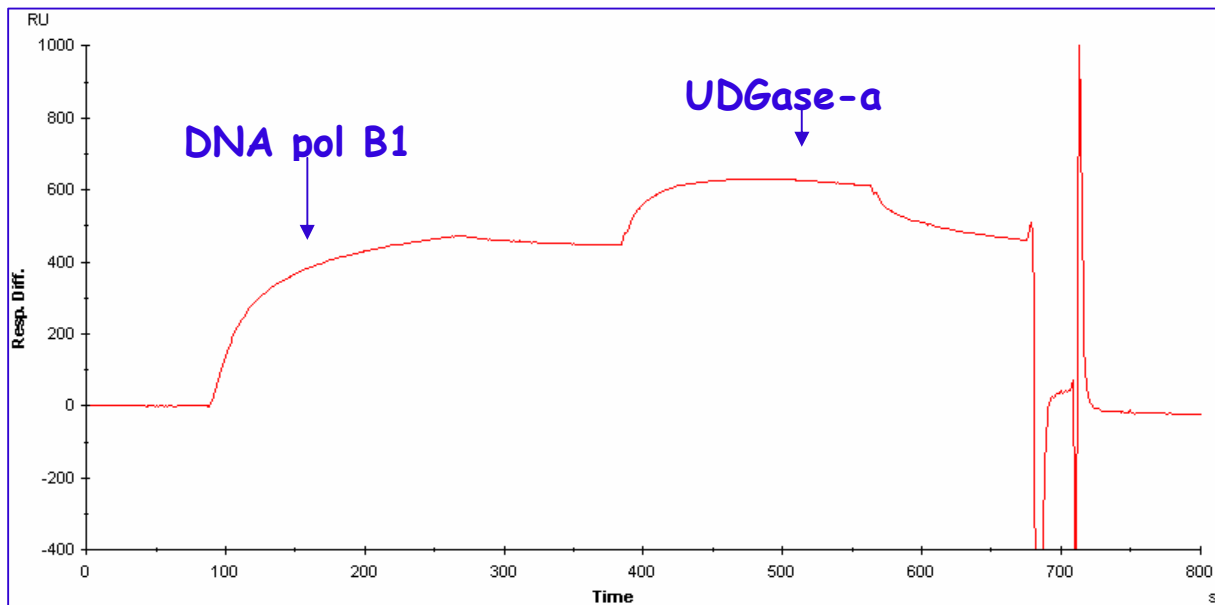


Fig 3.9 sensorgramma DNA pol B1 e UDGasi-a sequenziale. Il ligando è la DNA pol Y1. 50 pmoli di PolB1 e 50 pmoli di UDGasi-a sono flussati sul chip separatamente una dopo l'altra rispettivamente.

3.7 Purificazione delle forme tronche della DNA polB1

Mi sono chiesto, quindi, quale fosse la regione della DNA pol B1 responsabile dell'interazione con la DNA pol Y1. A tale scopo ho deciso di produrre diverse forme tronche della proteina (fig 3.10)

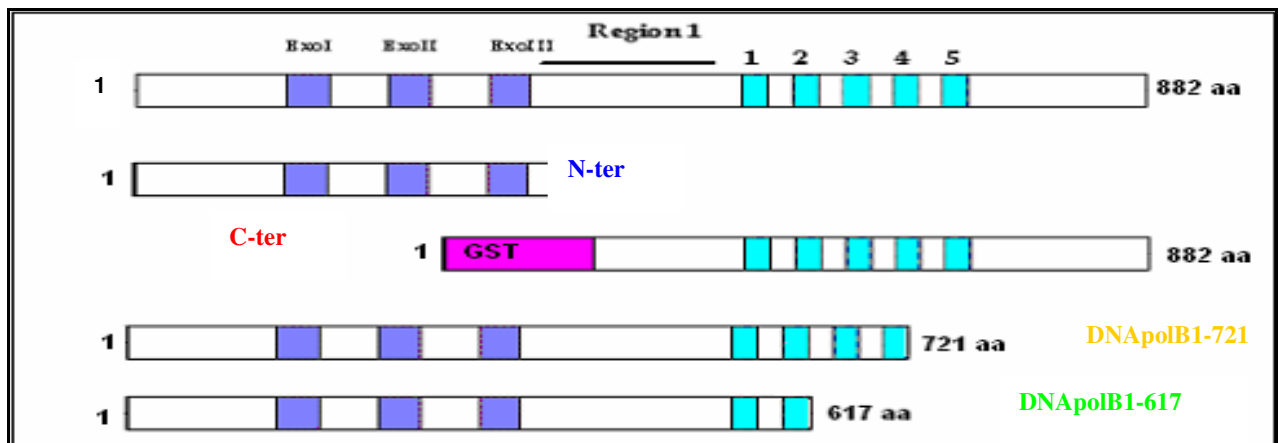


Fig. 3.10 Produzione delle forme tronche. Rappresentazione schematica della catena polipeptidica della Sso PolB1 e delle sue forme tronche.

Le prime due forme tronche prodotte “imitano” il taglio proteolitico che subisce spontaneamente la DNA pol B1. La forma tronca N-terminale, N-ter, (residui 1-481) ha un peso molecolare di circa 50 kDa e contiene nella sua sequenza i domini Exo I-II-III. La forma tronca C-terminale, C-ter, (residui 482-882) è di 40 kDa, ed oltre ai 5 motivi polimerasici comprende un loop idrofilico di circa 30 residui.

La proteina N-ter, è stabile in soluzione ed è stata purificata utilizzando la stessa procedura descritta per la DNA pol B1 (fig. 3.11).

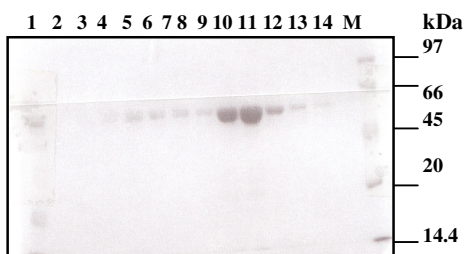


Fig. 3.11 Purificazione del N-ter. SDS-PAGE del N-ter: rifiutato dalla colonna Ni⁺⁺-NTA (linea 1), frazioni di lavaggio (linea 2), frazioni eluite (linea 3-14), marcatori di peso molecolare (linea M).

La proteina C-ter è stata invece prodotta come chimera con la GST (Glutathione S-Transferasi) per renderla più stabile in soluzione. L'estratto cellulare è stato caricato su una resina di *Glutathione-Sepharose*. La proteina adsorbita era eluita con una soluzione 10 mM glutathione ridotto (vedi Materiali e Metodi). Non è stato possibile effettuare il taglio proteolitico con trombina poiché dopo l'allontanamento della GST, la proteina C-terminale risultava altamente degradata (fig. 3.12)

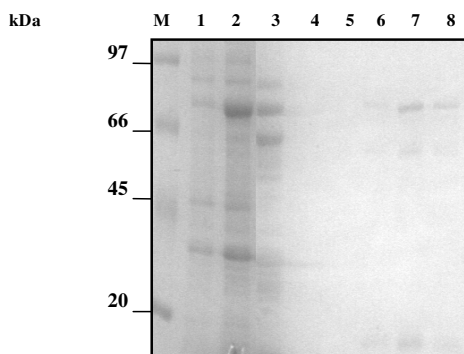


Fig. 3.12 Purificazione del GST-C-ter. SDS-PAGE del GST-C-ter. Marcatori (linea M), coltura cellulare prima dell'induzione (linea 1), estratto cellulare dopo l'induzione (linea 2), rifiutato dalla colonna Glutathione-Sepharose (linea 3-4), frazione di lavaggio (linea 5), frazioni eluite (linea 6-8).

Essendo difficile ottenere frammenti stabili della porzione C-terminale, si è proceduto al clonaggio ed alla purificazione di nuovi mutanti di delezione della proteina *wild-type*.

DNA PolB1-721 (residui 1-721), ha un peso molecolare di circa 80 kDa. Il secondo mutante, DNA PolB1-617 (residui 1-617), ha un peso molecolare di circa 68kDa. Entrambe le proteine hanno una coda di 6 istidine all'amminoterminale.

Mentre la DNA PolB1-721 subisce lo stesso procedimento di purificazione delle proteine PolB1 e N-ter (fig. 3.13), la DNA PolB1-617, non è in grado di interagire con la resina Ni^{+} -NTA *chelate* nonostante la presenza della coda di istidine, suggerendo che tale coda di istidine non è esposta.

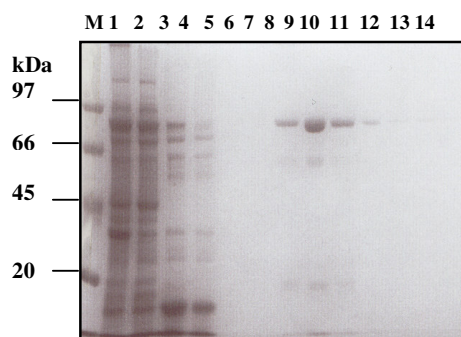


Fig. 3.13 Purificazione di DNA pol B1-721. SDS-PAGE della DNA PolB1-721 , marcatori (linea M), estratto cellulare (linea 1-2), estratto cellulare trattato al calore (linea 3), rifiutato dalla colonna Ni^{+} -chelate (linea 4), frazioni di lavaggio (linea 5-6), frazioni eluite (linea 7-14)

Per questo motivo il procedimento di purificazione è stato modificato. Dopo un trattamento al calore dell'estratto cellulare, il campione è stato caricato su una colonna a scambio anionico (Mono Q Amersham Pharmacia), le frazioni contenenti la proteina sono state riunite e dializzate (vedi Materiali e Metodi). È stato quindi effettuato un ulteriore passo di purificazione su *Heparin sepharose*. 20 μ l di ciascuna frazione sono stati caricati su gel SDS/poliacrilammide (fig 3.14). Le frazioni contenenti la proteina sono state riunite. Il campione è stato concentrato fino a raggiungere un valore della concentrazione proteica di 0.8 mg/ml.

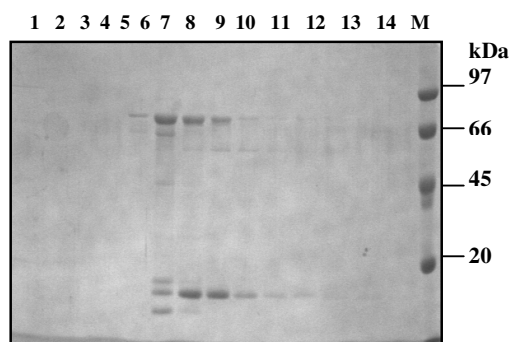


Fig. 3.14 Purificazione di DNA pol B1-617. SDS-PAGE della DNA PolB1-617 frazioni eluite dalla colonna di eparina (linea 1-14), marcatori di peso molecolare (linea M)

3.8 Surface Plasmon Resonance delle forme tronche della DNA Pol B1

Anche per le forme tronche è stata effettuata l'analisi di interazione con la SPR. Come descritto in precedenza per la Sso PolB1, quantità crescenti di ciascun mutante sono state iniettate sul *chip* su cui era stata precedentemente immobilizzata la DNA pol Y1.

Il sensorgramma mostrava un andamento piatto quando venivano flussate quantità crescenti di N-Ter (fig 3.15). Tali risultati suggeriscono che i primi 481 amminoacidi della catena polipeptidica di DNA Pol B1 non sono responsabili della interazione con la DNA pol Y1.

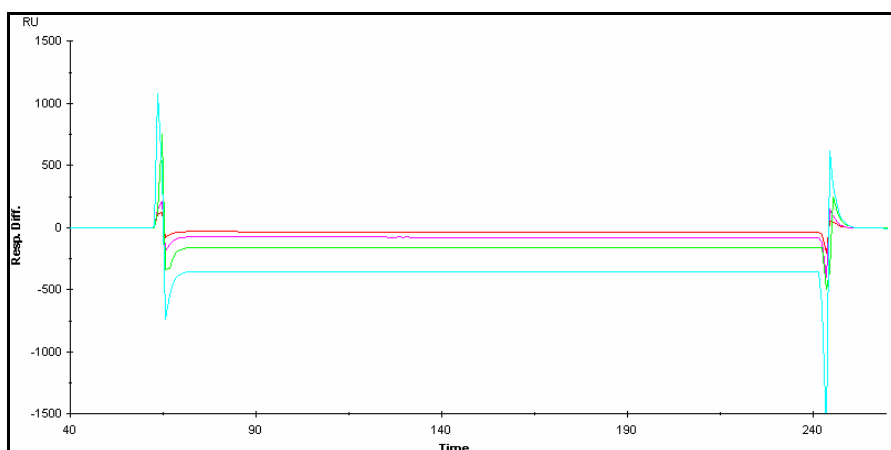


Fig 3.15 sensorgramma del mutante tronco N-ter. Il ligando è la Pol Y1. 50 (rosso), 100 (magenta), 200 (verde), 400 (azzurro) pmol sono flussati sul chip.

Comportamento diverso ha invece la chimera GST-C-terminale. Il profilo presenta un picco iniziale, poi la curva discende ed assume un andamento paragonabile alla DNA Pol B1 (fig 3.16). Anche in questo caso la curva cresce all'aumentare di analita flussato.

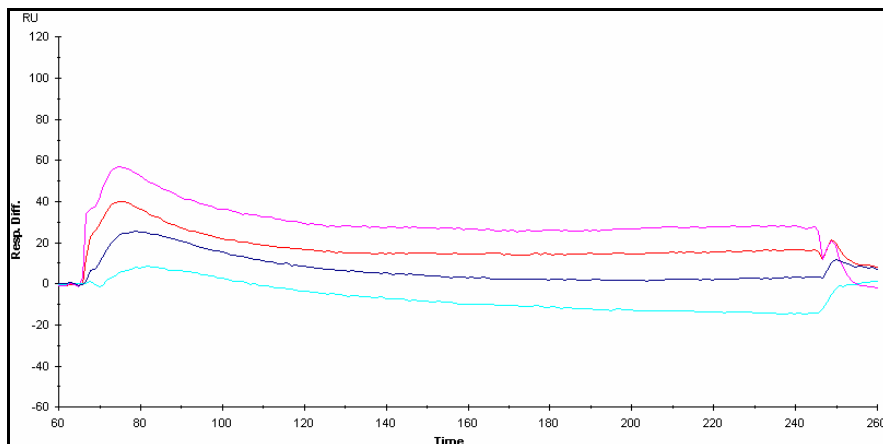


Fig 3.16 sensorgramma GST-C-ter. Il ligando è la Pol Y1. 50 (rosso), 100 (magenta), 200 (verde), 400 (azzurro) pmol sono flussati sul chip.

È quindi ipotizzabile che la regione che include gli amminoacidi 482-882 comprenda i residui responsabili dell'interazione tra le due proteine.

Anche la DNA Pol B1-721, che manca degli ultimi 160 residui amminoacidici, determina una risposta che aumenta con l'aumentare della quantità di DNA PolB1-721 flussata sul *chip* (fig 3.17).

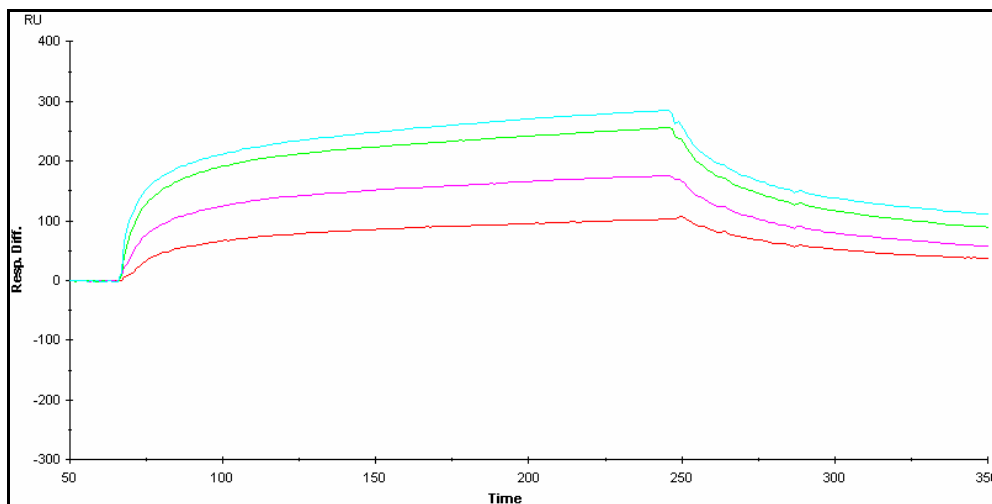


Fig 3.17 sensorgramma della DNA pol B1-721. Il ligando è la Pol Y1. 50 (rosso), 100 (magenta), 200 (verde), 400 (azzurro) pmol sono flussati sul chip.

La DNA pol B1- 617 mostra una affinità per il ligando paragonabile a quella della DNA pol B1- 721. Ho quindi deciso di ridurre le quantità di proteina da fluire. La proteina è stata quindi diluita 1:10 e quantità crescenti di tale diluizione sono stati usati come analita (fig 3.18).

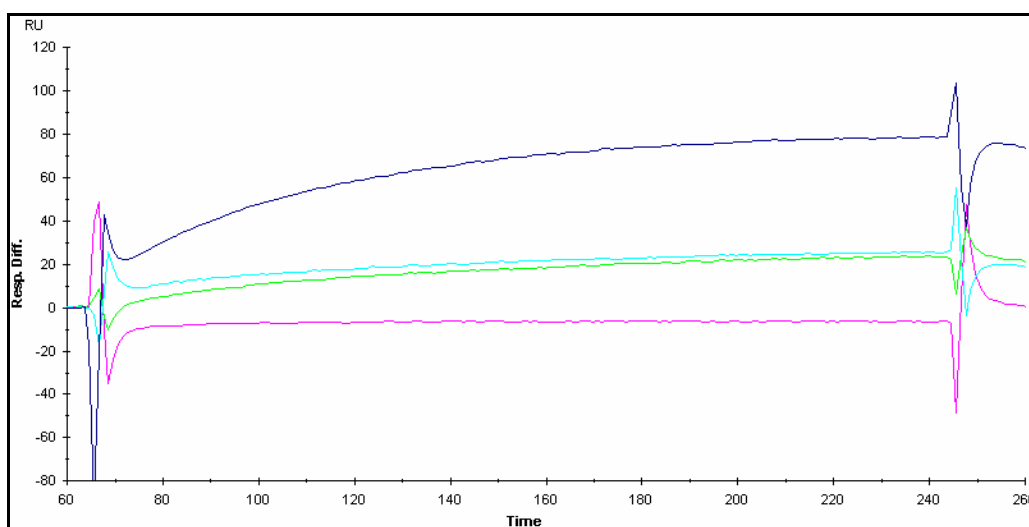


Fig 3.18 sensorgramma della DNA pol B1-617. Il ligando è la Pol Y1. 12 (magenta), 24 (verde), 48 (azzurro), 72 (blu) pmol sono flussati sul chip.

Sul *chip* contenente la DNA pol Y1 come ligando, ho infine flussato le stesse quantità di ciascuna proteina. Come si può osservare dal sensorgramma (fig.3.19) i polipeptidi DNA pol B1-617 e 721 mostrano una maggiore affinità di legame per la DNA pol Y1 suggerendo che la regione C-terminale della DNA polB1 crea un ingombro sterico che interferisce con la formazione di un complesso DNA pol B1/Y1 stabile.

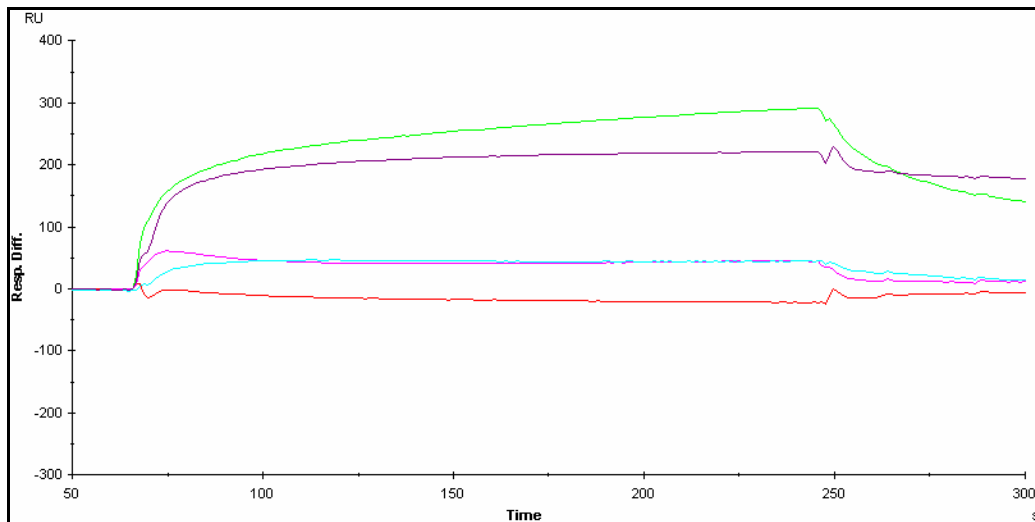


Fig 3.19 sensorgramma della DNA pol B1 e le sue forme tronche. Il ligando è la Pol Y1 e sul chip sono flussare le varie proteine. N-ter (rosso), DNA pol B1 (azzurro), C-ter (magenta), DNA pol B1-617 (viola), DNA pol B1-721 (verde).

4. Discussione

Il genoma degli organismi viventi è costantemente minacciato da agenti, endogeni o esogeni, che modificano l'integrità biochimica del DNA. L'efficiente azione dei meccanismi di riparo rimuove le lesioni dal genoma senza introdurre errori, ma quelle che sfuggono a tali sistemi possono interferire durante la replicazione. Le DNA polimerasi replicative non sono capaci di copiare le lesioni, ma le cellule possiedono in aggiunta DNA polimerasi capaci di effettuare la *Trans-lesion Synthesis* (TLS) e di sintetizzare DNA di fronte agli errori. Con la scoperta di DNA polimerasi specializzate nella TLS è diventato chiaro che il *bypass* delle lesioni potrebbe richiedere la collaborazione di diverse DNA polimerasi.

L'ipotesi più attendibile è che la DNA polimerasi replicativa venga transitoriamente sostituita, nelle vicinanze del danno, da una o più TLS DNA polimerasi per poi riprendere la replicazione (fig 4.1).

Il danno più comune al DNA è la lesione ad una singola base. Le basi del DNA possono essere perse durante il processo di replicazione o possono subire mutazioni dovute ad agenti chimici. Un tipo di lesione molto frequente delle basi del DNA è la formazione di uracile. L'uracile è prodotto o dalla deaminazione spontanea della citosina o da un'incorporazione erronea di dUMP da parte della polimerasi durante la replicazione. L'uracile e i prodotti analoghi che derivano dall'ossidazione della citosina vengono rimossi dal DNA da uracil-DNA glicosilasi (UDGasi).

Il mantenimento dell'integrità dell'informazione genetica rappresenta un interessante argomento di studio negli organismi che vivono alle alte temperature. È stato infatti dimostrato che le molecole di DNA subiscono processi di mutazioni spontanei quali deaminazione, depurinazione e ossidazione, e tali fenomeni sono notevolmente accelerati alle alte temperature. Questo suggerisce che gli organismi ipertermofili hanno efficienti enzimi di riparo e replicazione del DNA.

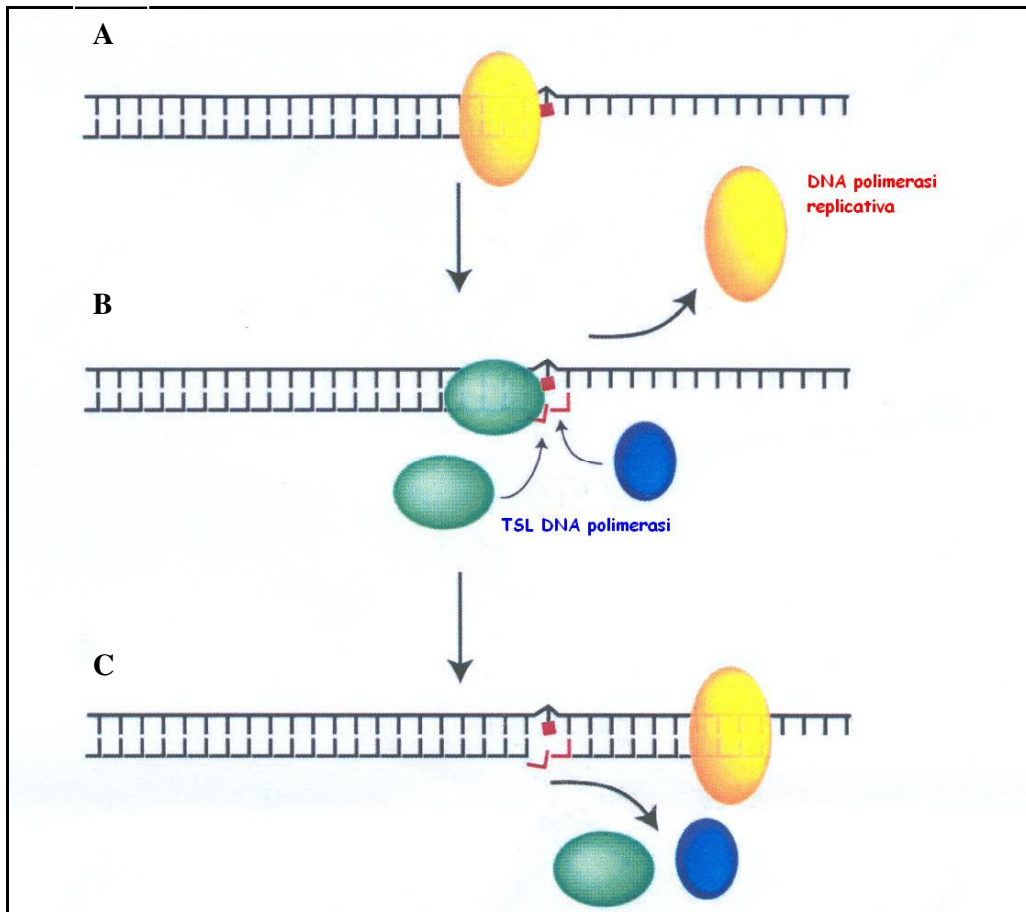


Fig 4.1 Intervento delle TLS DNA polimerasi. Lo figura riassume in maniera schematica l'intervento delle TLS DNA polimerasi. Il quadratino rosso rappresenta una lesione presente sul doppio filamento. A, blocco della DNA pol replicativa, B, inserzione ed estensione prodotta da una TLS DNA pol; C, ripresa della replicazione.

Anche il crenarchaeota *S. sulfataricus* oltre alla DNA polimerasi replicativa (DNA pol B1), possiede una DNA polimerasi capace di effettuare la *trans-lesion synthesis*: la DNA pol Y1 e una Uracil-DNA Glicosilasi.

Entrambe le polimerasi hanno degli alti livelli di espressione cellulare, rispettivamente 1500 e 4000 molecole/cellula, quantità paragonabili ai livelli di espressione della DNA polIV (DinB) di *E.coli*. L'elevata espressione potrebbe essere spiegata dal fatto che la maggior parte delle molecole sono occupate nel riparo dei numerosi danni che l'alta temperatura induce sul cromosoma dell'organismo (Gruz *et al* 2003).

È stato anche studiato il comportamento delle due DNA polimerasi, in presenza dei danni che possono presentarsi sul template durante la replicazione e la DNA polY1 mostra una buona capacità di superamento di varie lesioni, mentre ci sono ancora delle incertezze per quanto riguarda il suo comportamento nei confronti dei siti AP. Sommando queste due caratteristiche, elevato numero di copie e capacità di superamento dei danni, si può ipotizzare che la DNA pol Y1 giochi un ruolo importante nel mantenimento della stabilità genomica.

Come già detto una delle ipotesi più comuni è lo scambio tra le DNA polimerasi replicative e le DNA polimerasi del riparo quando sul filamento stampo è presente una lesione anche se ancora non si conoscono quali siano i meccanismi che lo inducono. Probabilmente le DNA polimerasi sono aidate dall'uracil-DNA glicosilasi nella rimozione del danno sul DNA. Un'altra ipotesi è che solo dopo che l'uracil-DNA glicosilasi ha rimosso la base danneggiata (in particolare l'uracile) le due polimerasi possono scambiarsi.

Il mio lavoro di tesi si è focalizzato sulla produzione di SsoUDGasi-a in forma ricombinante in *E. coli*. Quindi ho caratterizzato l'enzima dal punto di vista biochimico analizzando la sua capacità di rimuovere l'uracile da molecole di DNA sia a singolo che a doppio filamento.

Successivamente, ho analizzato l'interazione fra la DNA pol B1 e Y1, mediante la SRP, usando una volta la DNA pol B1 come analita e DNA pol Y1 come ligando e viceversa. L'interazione è stata confermata anche con un esperimento di immunoprecipitazione.

Quindi, mediante la SPR, ho analizzato anche l'interazione fra il complesso polB1-polY1 e l'UDGasi-a, dimostrando che la UDGasi-a interagisce solo con l'intero complesso delle polimerasi e non con gli enzimi separatamente.

Concentrandomi sulla struttura della pol B1, ho clonato e purificato dei mutanti di delezione, per meglio comprendere quale fosse la regione responsabile dell'interazione con la DNA polY1 durante la formazione del complesso. Anche i mutanti sono stati flussati sul *chip* a cui era stata precedentemente immobilizzata la DNA pol Y1.

I grafici ottenuti suggeriscono che i primi 480 residui che compongono la catena polipeptidica della DNA pol B1 non sono coinvolti nell'interazione con la DNA polY1. La regione coinvolta nella formazione del complesso è quella compresa tra i residui 482-882.

I mutanti di delezione DNA polB1-721 e 617, mostrano un'affinità ancora maggiore della proteina intera ed inoltre il complesso DNA polY1/B1-617 è difficile da dissociare.

I risultati ottenuti suggeriscono che i residui coinvolti sono quelli tra il 480-617, che costituiscono il *loop* idrofilico e i *fingers* della DNA pol B1.

Molto probabilmente è proprio il *loop*, la parte più flessibile della molecola, ad essere interessata a questa interazione e la regione C-terminale ha la funzione di “fattore disturbo” rendendo il complesso meno stabile e facilmente dissociabile.

Sulla base dei risultati ottenuti potremmo quindi ipotizzare un sistema replicativo in cui le due DNA polimerasi formano un complesso che si muove sul filamento stampo (fig 4.2), ma non è ancora chiaro però quando tale complesso interagisca con la UDGasi-a. Infatti possiamo ipotizzare due alternative, la prima prevede che l'UDGasi-a interagisca con il complesso polB1-polY1 solo dopo che tale complesso ha superato il danno. Una seconda ipotesi prevede invece che l'UDGasi-a e polB1-polY1 viaggino assieme sul DNA.

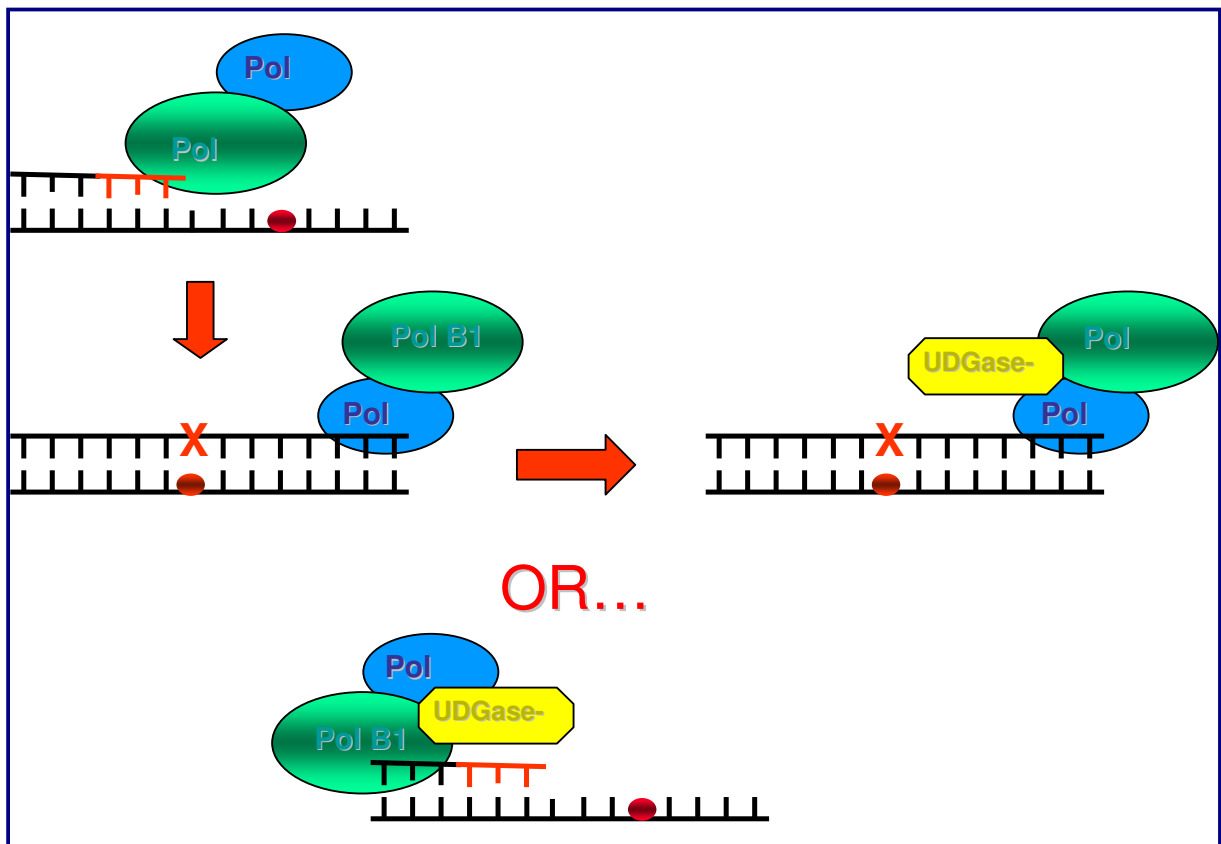


Fig 4.2 Ipotetici meccanismi d'azione delle DNA pol B1 e DNA pol Y1

5. Bibliografia

- Blanco L, Bernad A, Blasco MA, Salas M. 1991 *Gene.*;100:27-38. Erratum in: *Gene.*, 1;108(1):165.
- Boudsocq F, Iwai S, Hanaoka F, Woodgate R. 2001 *Nucleic Acids Res.*, 15;29(22):4607-16
- Boulikas T., (1996), *J. Cell. Biochem.*, 60(3), 297-316. Review.
- Braithwaite DK, Ito J., 1993, *Nucleic Acids Res.*, 25;21(4):787-802.
- Cann IK, Ishino S, Nomura N, Sako Y, Ishino Y., 1999 *J Bacteriol.*; 181(19):5984-92.
- Cann IK, Ishino Y., 1999 *Genetics*; 152(4):1249-67. Review.
- Cunningham RP., 1997 *Mutat. Res.*, 383(3): 189-96. Review.
- Doetsch PW, Cunningham RP, 1990 *Mutat. Res.*, 236(2-3): 173-201. Review.
- Edgell DR, Doolittle WF., 1997 *Cell.*, 27;89(7):995-8. Review.
- Fortini P, Pascucci B, Parlanti E, D'Errico M, Simonelli V, Dogliotti E., 2003 *Biochimie.* 85(11): 1053-71. Review.
- Gallinari P., Jiricny J., 1996 *Nature*,383(6602): 735-8.
- Gruz P, Shimizu M, Pisani FM, De Felice M, Kanke Y, Nohmi T., 2003 *Nucleic Acids Res.*, 31(14):4024-30.
- Haushalter K.A., Todd Stukenberg M.W., Kirschner M.W., Verdine G.L., 1999 *Curr. Biol.*, 9(4): 174-85.
- Hinks J.A., Evans M.C., De Miguel Y., Sartori A.A., Jiricny J., Pearl L.H., 2002 *J. Biol. Chem.*, 277(19): 16936-40.

- Iwai T, Kurosawa N, Itoh YH, Kimura N, Horiuchi T., 2000 *DNA Res.*, 7(4):243-51.
- Kawarabayasi Y, Hino Y, Horikawa H, Yamazaki S, Haikawa Y, Jin-no K, Takahashi M, Sekine M, Baba S, Ankai A, Kosugi H, Hosoyama A, Fukui S, Nagai Y, Nishijima K, Nakazawa H, Takamiya M, Masuda S, Funahashi T, Tanaka T, Kudoh Y, Yamazaki J, Kushida N, Oguchi A, Kikuchi H, et al. 1999 *DNA Res.*, 30;6(2):83-101, 145-52.
- Krokan HE., Standal R., Slupphang G., 1997 *Biochem J.*, 325(Pt.1): 1-16; Review.
- Kulaeva OI, Koonin EV, McDonald JP, Randall SK, Rabinovich N, Connaughton JF, Levine AS, Woodgate R. 1996 *Mutat Res*, 25;357(1-2):245-53.
- Lindahl T, Nyberg B. 1974 *Biochemistry*, 13(16); 3405-10.
- Lindahl T., 1982 *Annu. Rev. Biochem.*, 51: 61-87; Review.
- Lindahl T., 1993 *Nature*, 362(6422): 709-15; Review.
- Liu Y., Prasad R., Beard W.A., Kedar P.S., Hou E.W., Shock D.D., Wilson S.H., 2007 *J. Biol. Chem.*, 282(18): 13532-41.
- Ling H, Boudsocq F, Woodgate R, Yang W. 2001 *Cell*, 5;107(1):91-102.
- Lobry J.R., (1996), *Mol. Biol. Evol.*, 13(5): 600-5.
- Lundgren M., Andersson A., Lanming C., Nilsson P. and Bernander R., 2004 *PNAS*, 101: 7046-7050.
- Matsumoto Y., Kim K., 1995 *Science*, 269(5224): 699-702.
- Mol C.D., Arvai A.S., Slupphaug G., Kavli B., Alseth I., Krokan H.E., Tainer J.A., 1995 *Cell* 80(6): 869-78.

- Myllykallio H., Lopez P., Lopez-Garcia P., Heilig R., Saurin W., Zivanovic Y., Philippe H. and Forterre P., 2000 *Science*, 288: 2212-2215.
- Neddermann P., Jiricny J., 1993 *J. Biol. Chem.*, 268(28): 21218-24.
- Nohmi T., 2006 *Annu. Rev. Microbiol.*, 60:231-53; Review.
- Olsen GJ and Woese CR, 1997 *Cell* 89: 991-994.
- Pearl LH, 2000 *Mutat Res*, 460(3-4): 165-81; Review.
- Percival KJ., Klein MB., Burgers PM., 1989 *J. Biol. Chem.*, 264(5): 2593-8.
- Pereira S.L., Grayling R.A., Lurz R. and Reeve J.N., 1997 *PNAS*, 94:12633-12637.
- Piersen, C.E., Prasad, R., Wilson, S.H., and Lloyd, R.S., 1996 *J. Biol. Chem.*, 271(30): 17811-5.
- Pisani FM, De Felice M, Manco G, Rossi M. 1998 *Extremophiles.*, ;2(3):171-7. Review.
- Putnam CD., Shroyer MJ., Lundquist AJ., Mol CD., Arvai AS., Mosbaugh DW., Tainer JA., 1999 *J. Mol. Biol.*, 287(2): 331-46.
- Reeve J.N., Sandman K. and Daniels C.J., 1997 *Cell*, 89: 999-1002.
- Robinson N. P., Dionne L., Lundgren M., Marsh V. L., Bernander R. and Bell S. D., 2004 *Cel*, 116: 25-38.
- Sandigursky M., Franklin W.A., 1999 *Curr. Biol.*, 9(10): 531-4.
- Sandigursky M., Franklin W.A., 2000 *J. Biol. Chem.*, 275(25): 19146-9.
- Sartori AA., Fitz-Gibbon S., Yang H., Miller JH., Jiricny,J., 2002 *EMBO J.*, 21(12): 3182-91.

- Savva,R., McAuley-Hecht,K., Brown,T. and Pearl,L.H., 1995 *Nature*, 373(6514): 487-93.
- Slupphaug G., Markussen FH., Olsen LC., Aasland R., Aarsaether N., Bakke O., Krokan HE. and Helland DE., 1993 *Nucleic Acids Res.*, 21(11): 2579-84.
- Starkuviene V., Fritz H.J., 2002 *Nucleic Acids Res.*, 30(10): 2097-102.
- Tuteja N, Singh MB, Misra MK, Balla PR, Tutela R. 2001 *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*; 36(4): 337-97. Review.
- Woese C. R., Kandler O., Wheelis M. L., 1990 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 4576-79.
- Yang H., Fitz-Gibbon S., Marcotte EM., Tai JH., Hyman EC., Miller JH., 2000 *J Bacteriol.*, 182(5): 1272-9.
- Yang W., 2005, *FEBS Lett.*, 7;579(4):868-72. Review.

